

Université de Montréal

# **Altérations synaptiques à la jonction neuromusculaire dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique**

par  
Elsa Tremblay

Département de Neurosciences  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)  
en sciences neurologiques  
2-530-1-0

Août 2015

© Elsa Tremblay, 2015

## Résumé

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par la dégénérescence progressive des neurones moteurs centraux et périphériques. L'un des premiers signes de la maladie est la dénervation de la jonction neuromusculaire (JNM). Les diverses unités motrices (UM) ne présentent toutefois pas la même vulnérabilité à la dénervation dans la SLA: les UM rapide fatigables sont en fait les plus vulnérables et les UM lentes sont les plus résistantes. Alors que des études précédentes ont démontré dans plusieurs modèles animaux de la SLA de nombreuses variations synaptiques, les découvertes ont été contradictoires. Par ailleurs, le type d'UM n'a pas été tenu en compte dans ces divers travaux. Nous avons donc émis l'hypothèse que la présence de la mutation SOD1 pourrait affecter différemment la transmission synaptique des UM, en accord avec leur vulnérabilité sélective. En effectuant des enregistrements électrophysiologiques et de l'immunohistochimie, nous avons étudié la transmission synaptique des différents types d'UM du muscle à contraction rapide *Extensor Digitorum Longus* (EDL; rapide fatigable (FF) MU) et du muscle à contraction lente *Soleus* (SOL; lente (S) and rapide fatigue-résistante (FR) MU) de la souris SOD1<sup>G37R</sup> et leur congénères WT. Pour identifier le type d'UM, un marquage par immunohistochimie des chaînes de myosine a été effectué. Un triple marquage de la JNM a également été effectué pour vérifier son intégrité aux différents stades de la maladie. À P160, dans la période asymptomatique de la maladie, alors qu'aucune altération morphologique n'était présente, l'activité évoquée était déjà altérée différemment en fonction des UM. Les JNMs FF mutantes ont démontré une diminution de l'amplitude des potentiels de plaque motrice (PPM) et du contenu quantique, alors que les JNMs lentes démontraient pratiquement le contraire. Les JNMs FR montraient quant à elles une force synaptique semblable au WT. À P380, dans la période présymptomatique, de nombreuses altérations morphologiques ont été observées dans le muscle EDL, incluant la dénervation complète, l'innervation partielle et les extensions du nerf. La transmission synaptique évoquée des UM FF étaient toujours réduites, de même que la fréquence des potentiels de plaque motrice miniatures. À P425, à l'apparition des premiers symptômes, l'activité synaptique des JNMs S était redevenue normale alors que les JNMs FR ont montré à ce moment une diminution du contenu quantique par rapport au

contrôle. De manière surprenante, aucun changement du ratio de facilitation n'a été observé malgré les changements flagrants de la force synaptique. Ces résultats révèlent que la fonction de la JNM est modifiée différemment en fonction de la susceptibilité des UM dans l'ALS. Cette étude fournit des pistes pour une meilleure compréhension de la physiologie de la JNM durant la pathologie qui est cruciale au développement d'une thérapie adéquate ciblant la JNM dans la SLA.

**Mots-clés** : Jonction neuromusculaire, Unités motrices, Sclérose latérale amyotrophique, Électrophysiologie, Transmission synaptique

## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal late-onset neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of upper and lower motor neurons. Denervation of the neuromuscular junction (NMJ) is an early pathological event in various ALS models. Motor units (MU) appear unequally susceptible to denervation, the fast fatigable (FF) MU being the most vulnerable and the slow (S) MU the most resistant. While previous studies in several ALS models have consistently reported alterations in synaptic transmission, their findings have been contradictory. Interestingly, the MU types were not taken into account in these studies, which could explain these discrepancies. We hypothesized that the MU selective vulnerabilities observed in ALS will be associated with MU-specific NMJ alterations throughout the disease course. Using electrophysiology, we studied synaptic transmission of different types of MU in the fast-twitch *Extensor Digitorum Longus* (EDL; fast fatigable (FF) MU) and the slow-twitch *Soleus* (SOL; slow (S) and fast fatigue resistant (FR) MU) of the SOD1 mice and their WT littermates. MU types were identified using immunohistochemical labelling of the respective myosine heavy chains. Immunohistochemistry was also performed to assess NMJ integrity by using antibodies against main NMJ components. At a presymptomatic stage (P160), while no morphological alterations of NMJs were seen in both muscles, evoked activity was altered in a MU-specific manner in SOD1 mice. FF MU from SOD1 mice showed a decrease in EPP amplitude and quantal content whereas S MU showed the opposite. Mutant FR MU showed no difference in evoked activity compared to WT. At presymptomatic stage (P380), various morphological alterations were seen in the SOD1 EDL, including denervation, partial innervation and nerve sprouting. Evoked activity was still reduced in FF MU, as well as mEPP frequency. In contrast, at disease onset (P425), synaptic strength of the S MU was now similar to WT MU, whereas FR NMJs showed a decrease in EPP amplitude and quantal content. Surprisingly, paired-pulse facilitation was not altered in any MU type and at any age despite changes in synaptic strength. Taken together, these results reveal that NMJ function is differentially modified according to MU susceptibility in ALS. This study provides insights for a better understanding of NMJ physiology during the illness that is crucial to the development of a proper NMJ-targeted treatment in ALS.

**Keywords** : Neuromuscular junction, Motor unit, Amyotrophic lateral sclerosis, Electrophysiology, Synaptic transmission

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures .....	ix
Liste des sigles .....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
<b>Chapitre 1 : Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
Préambule .....	2
1.1 Sclérose latérale amyotrophique .....	2
1.1.1 Description.....	2
1.1.2 Symptomatologie .....	3
1.1.2.1 Forme bulbaire .....	3
1.1.2.2 Forme spinale.....	4
1.1.3 Diagnostic .....	4
1.1.4 Étiologie.....	6
1.1.4.1 Facteurs environnementaux .....	6
1.1.4.2 Mutations génétiques .....	7
1.2 Protéine Superoxyde dismutase SOD1 .....	9
1.2.1 Fonctions et propriétés de l'enzyme.....	9
1.2.2 Toxicité SOD1 dans la sclérose latérale amyotrophique .....	10
1.2.2.1 Modèles animaux SOD1 .....	11
1.2.2.2 Activité enzymatique .....	12

1.2.2.3 Agrégation.....	13
1.2.2.4 Excitotoxicité .....	14
1.2.2.4 Rôle des cellules gliales dans la SLA .....	15
1.3. Jonction neuromusculaire .....	18
1.3.1 Élément présynaptique.....	20
1.3.1.1 Structure générale .....	20
1.3.1.1 Zones actives et entrée calcique.....	20
1.3.1.1 Exocytose et libération de neurotransmetteurs .....	21
1.3.1.1 Exocytose et libération de neurotransmetteurs .....	21
1.3.1.1 Contenu quantique .....	22
1.3.1.2 Autorécepteurs et transmission synaptique.....	24
1.3.2 Fente synaptique .....	25
1.3.3 Élément postsynaptique .....	25
1.3.3.1 Structure organisationnelles .....	26
1.3.3.2 Potentiel de plaque motrice.....	26
1.3.4 Élément glial : les cellules de Schwann pérисynaptiques.....	27
1.3.4.2 Fonctions.....	28
1.3.5 Unités motrices .....	29
1.3.5.1 Classement des unités motrices .....	31
1.3.5.2 Différences morphologiques entre les unités motrices .....	31
1.3.5.3 Propriétés contractiles et synaptiques des unités motrices .....	32
1.4. La jonction neuromusculaire dans la SLA.....	33
1.4.1 Altérations morphologiques de la JNM .....	33
1.4.1.1 Dénervation et détachement des protéines.....	33
1.4.1.2 Vulnérabilité différentielle des neurones moteurs et unités motrices .....	34
1.4.2 Altérations synaptiques.....	36
1.4.2.1 Altérations de l'excitabilité des motoneurones .....	36
1.4.2.2 Altérations de la transmission synaptique à la JNM.....	38

1.5. Objectifs .....	42
----------------------	----

<b>Chapitre 2. Opposite synaptic alterations at the neuromuscular junction in an ALS mouse model: when motor unit matters .....</b>	<b>43</b>
---	-----------

2.1 Abstract .....	44
--------------------	----

2.2 Introduction .....	45
------------------------	----

2.3 Material and methods .....	47
--------------------------------	----

2.4 Results .....	53
-------------------	----

2.5 Discussion .....	69
----------------------	----

<b>Chapitre 3 : Sommaire général et discussion .....</b>	<b>76</b>
--	-----------

3.1 Discussion .....	76
----------------------	----

3.1.1 Perturbations précoces de l'activité évoquée .....	77
--	----

3.1.2 Mécanismes explicatifs des altérations de la transmission synaptique .....	79
--	----

3.1.3 Intégration des altérations de la transmission synaptique et des changements morphologiques .....	81
---	----

3.1.4 Conséquences fonctionnelles possibles des altérations de la neurotransmission des UM .....	82
--	----

3.1.5 Conséquences possibles des changements sur les cellules gliales à la JNM .....	83
--	----

3.1.6 Analyse intégrée de l'activité du MN et des altérations des UM dans la SLA .....	85
--	----

3.1.7 Évidence d'une dysrégulation calcique au sein des MN et de la terminaison axonale .....	87
---	----

3.1.8 Présence de mécanismes compensateurs et maintien d'une homéostasie relative dans la SLA .....	89
---	----



Conclusion .....	91
Bibliographie.....	i
Annexe 1 : Grille d'analyse immunohistochimique .....	i

# Liste des figures

## Chapitre 1 : Introduction générale

1.1. Mécanismes possibles de toxicité de la mutation SOD1 impliquant le motoneurone et les cellules gliales.....	18
1.2. Morphologie de la jonction neuromusculaire .....	20
1.3. Exocytose et transmission synaptique à la jonction neuromusculaire .....	23
1.4. Comparaison des propriétés des types d'unités motrice en fonction de la taille, du type de chaînes de myosine et de la résistance à la fatigue. ....	31
1.5. Altérations synaptiques dans la SLA. ....	37

## Chapitre 2 : Opposite synaptic alterations at the neuromuscular junction in an ALS mouse model: when motor unit matters

2.1. Time course of disease progression in the SOD1 <sup>G37R</sup> mice model.....	48
2.2. Recording method and fiber type identification in the SOL and the EDL. ....	52
2.3. Spontaneous activity is unaltered in S, FR and FF NMJs at P160 in SOD1 <sup>G37R</sup> mice .....	56
2.4. EPP amplitude and quantal content are significantly increased in S NMJs and decrease in FF NMJs of the SOD1 <sup>G37R</sup> mice at P160 .....	59
2.5. Motor Unit Synaptic Profile (MUSP) based on WT mice spontaneous and evoked synaptic transmission. ....	61
2.6. Morphological alterations of FF NMJs are striking at P380 in the EDL muscle, before symptom onset .....	63
2.7. Persistent quantal content reduction in the EDL at P380 is accompanied by alterations in spontaneous activity.....	64
2.8. At disease onset (P425), NMJs of the SOL show only mild morphological alterations in the SOD1 <sup>G37R</sup> mice model.....	66

2.9. Quantal content is reduced in FR MU of the SOL at time of disease onset in the mutant SOD1 mice.....	68
---	----

## Liste des sigles

ALS : Amyotrophic lateral sclerosis

CSP : Cellule de Schwann périssynaptique

EPP : Endplate potential

FF : Fast-fatigable / rapide-fatigable

FR : Fast fatigue-resistant / rapide résistante à la fatigue

FUS : Fused in sarcoma

GLM : Generalized linear model

JNM : Jonction neuromusculaire

mEPP : Miniature endplate potential

MNC : Motoneurone central

MNP : Motoneurone périphérique

MU : Motor unit

MUSP : Motor Unit Synaptic Profile

NMJ : Neuromuscular junction

PSC : Perisynaptic Schwann cell

PSUM : Profil synaptique des unités motrices

S : Slow / lente

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SOD1 : Superoxyde dismutase 1

UM : Unité motrice

## Liste des abréviations

Etc. : Et cætera

*À mon père, ce héros silencieux, qui a livré vaillamment un si lourd combat contre la SLA sans jamais courber l'échine. Cet homme d'exception m'a appris la rigueur, la persévérance, l'enthousiasme et la force de toujours sourire malgré les inévitables épreuves de l'existence. D'une force de caractère sans égal jusqu'au bout, je ne pourrais être plus fière d'avoir eu un tel père. Je ne cesserai jamais de porter sa présence en moi, et son souvenir continue de m'inspirer davantage chaque jour. Je dédie ce mémoire ainsi que le travail accompli dans les dernières années à mon papa, avec tout mon cœur et mon amour. Voici l'hommage posthume d'une fille envers son père, lui qui rêvait depuis toujours de me voir en sciences. Repose en paix, mon petit pépito.*

*À ma grand-mère, cette femme dynamique et étonnante elle aussi décédée des suites de la SLA, celle que j'ai vu traverser cette terrible maladie la première. À toutes les personnes atteintes de la SLA et leurs proches qui traversent de douloureux moments et doivent subir une série de deuils successifs que je connais trop bien, dans l'espoir que mes travaux aideront un jour à mieux soigner et améliorer les conditions de vie des malades.*

*À tous ceux qui ont cru en moi, merci infiniment, spécialement ma mère, ma petite sœur, mon frère et mon beau chéri, j'ai puisé ma force en vous pour mener à bien mon cheminement avec détermination. Vous m'avez donné des ailes.*

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier spécialement les membres de Team ALS, Éric Martineau et Danielle Arbour, puisque nous sommes avant tout une équipe. La force de l'union nous amène toujours plus loin! Merci pour votre support, votre collaboration et votre soutien tout au long de ce périple que représentait ma maîtrise. Merci également à tous les membres du laboratoire pour leur aide précieuse et leurs conseils qui m'ont permis d'en apprendre toujours plus. Merci à Houssam, Joanne, Noam, Anna, Sébastien, Ayman, Marco et Clare. Merci à tous les membres du laboratoire pour votre belle amitié.

Merci infiniment à mon superviseur de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné la chance de mener à bien mon projet de recherche dans une thématique qui me passionne. J'ai beaucoup apprécié ton aide et ton soutien, tes commentaires et suggestions qui me permettent toujours de me rendre un peu plus loin. Je suis très fière et heureuse d'avoir pu réaliser ma maîtrise avec un superviseur tel que toi.

Merci à mes parrains de comité de parrainage, Dr. Christine Vande Velde and Dr. Roberto Araya, pour les bons conseils et le soutien fourni durant ma maîtrise. Merci tout spécialement à Christine pour sa disponibilité, son écoute et son désir de toujours m'aider le plus possible dans mes démarches.

Merci à ma famille qui m'a soutenu depuis toujours, même si parfois mes choix ne sont pas faciles à suivre. Je ne serais pas là aujourd'hui sans vous. Je vous remercie de votre patience et de m'appuyer dans mes démarches, cela me fait vraiment chaud au cœur. Merci spécialement à ma mère, ma sœur Mylène et mon frère Jonathan. Finalement, merci à mon amoureux Philippe-Antoine, celui qui m'a soutenu, encouragé au quotidien et qui a vécu avec moi ces moments intenses de rédaction. Tu es mon allié, mon compagnon, ma douce moitié, tu m'a permis de garder le cap quand ma confiance vacillait. Je t'aime fort mon cœur, merci d'avoir été là.

## **Contribution des auteurs**

Le présent mémoire contient le manuscrit d'un article qui sera soumis prochainement. Éric Martineau sera le deuxième auteur de cet article en raison de son aide précieuse pour réaliser l'immunohistochimie du type de fibres pour le muscle EDL. De plus, il m'a donné un coup de main pour l'analyse statistique de l'immunohistochimie avec le modèle linéaire générale (GLM). Il a également travaillé à la réalisation de la figure 2.1 du présent document.

Également, la figure présentée en annexe, qui présente les 7 critères d'analyse d'immunohistochimie, a été réalisée par Danielle Arbour.





# Chapitre 1

## Introduction générale

### Préambule

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative fatale dont il n'existe malheureusement aucune thérapie permettant la guérison complète. Dans les dernières années, la découverte d'un nombre de plus en plus grands de gènes causant la maladie ont permis d'accélérer les recherches et de comprendre de mieux en mieux les mécanismes psychopathologiques causant la maladie. Toutefois, la SLA est une maladie extrêmement complexe impliquant de nombreuses altérations dans différents types cellulaires tels que les motoneurons et les cellules gliales, notamment les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. Il s'avère ainsi parfois difficile de séparer les éléments causatifs de la maladie des processus psychopathologiques représentant les conséquences des processus neurodégénératifs à l'œuvre. D'autant plus que la majorité des personnes atteintes présentent une forme sporadique alors qu'une plus faible proportion est causée par diverses mutations génétiques amenant nécessairement certaines variations phénotypiques et des mécanismes pathologiques quelque peu différents. Toutefois, il apparaît que de nombreuses anomalies semblent communes aux diverses formes de la maladie, notamment des altérations de la transmission synaptique et une dénervation de la jonction neuromusculaire, apparaissant très tôt dans la maladie. Le présent mémoire tente donc d'élargir nos connaissances sur cette thématique, afin d'éclairer notre compréhension des effets d'une mutation génétique (SOD1) sur la transmission synaptique. L'introduction générale qui suit a pour but d'aider le lecteur à mieux cerner la pathologie et les problématiques associées, de même que de fournir les informations pertinentes à la compréhension des thématiques de la présente étude. Les aspects abordés comprendront tout d'abord une description et une caractérisation de la SLA, une

présentation de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD1), des mutations associées causant la SLA et des éléments connus jouant un rôle dans la toxicité observée. Ensuite, la jonction neuromusculaire sera abordée plus en détails afin de mieux connaître ses différentes composantes et son rôle dans la transmission synaptique. Finalement, les altérations de la JNM dans la SLA permettront de terminer ce tour d'horizon et de préparer adéquatement le lecteur à la lecture de l'article du présent mémoire.

## **1.1 Sclérose latérale amyotrophique**

### **1.1.1 Description**

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale se caractérisant d'abord et avant tout par la dégénérescence des neurones moteurs supérieurs ou centraux (MNC) et inférieurs ou périphériques (MNP). La SLA est également connue sous la dénomination de maladie de Charcot, en l'honneur du médecin qui l'a le premier nommé ainsi en 1874 (Kumar et al., 2011). C'est par le biais d'observations consciencieuses des signes cliniques présentés par les patients atteints de maladies neurologiques et des corrélats anatomiques observés à leur décès qu'il a pu caractériser cette affection en tant que trouble distinct découlant de lésions spécifiques de la moelle épinière (Goetz, 2000). Aux États-Unis et au Canada, certains font référence à cette maladie sous le terme de maladie de Lou Gherig, un joueur de baseball renommé des ligues majeures américaines décédé en 1941 à 38 ans des suites de la SLA.

L'incidence de la SLA en Amérique du Nord et en Europe est plutôt basse, représentant environ 2 cas pour 100 000 individus en Europe, aux États-Unis et au Canada (Logroscino et al., 2008; Logroscino et al., 2010; Wolfson et al., 2009). Étant donné le faible taux de survie et la mort dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic, la prévalence demeure à une valeur faible de 5 à 8 / 100 000 (Couratier et al., 2014). Le risque pour un individu de développer la maladie au cours de sa vie est toutefois de 1 sur 400 pour les femmes et de 1 sur 350 pour les hommes, ceux-ci présentant donc un risque accru de développer la maladie

(Kiernan et al., 2011). Il n'existe aucun traitement de la maladie à l'exception du Riluzole, qui prolongerait de 3 à 6 mois la vie des personnes atteintes (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996), mais dont l'efficacité reste limitée.

## **1.1.2 Symptomatologie**

La SLA se caractérise au niveau pathologique par des signes de dégénérescence des neurones moteurs centraux (MNC) et périphériques (MNP), avec une atteinte du faisceau corticospinal, du tronc cérébral et des neurones cellules de la corne ventrale de la moelle épinière (Hardiman et al., 2011). Elle implique l'atteinte de multiples segments spinaux. On reconnaît les signes d'atteinte des MNC par la spasticité principalement, alors que la perte des MNP se traduit quant à elle par une atrophie musculaire, des fasciculations, une hyporéflexie et une perte du contrôle volontaire et tétanique de la force musculaire (Kent-Braun et al., 1998). Le premier site où il est possible d'observer le début des symptômes de la maladie peut varier considérablement d'un individu à l'autre. L'atteinte première peut ainsi toucher les muscles du tronc, d'un membre inférieur ou supérieur, les muscles respiratoires ou encore les muscles bulbaires (Kiernan et al., 2011), et influence le pronostic de survie des patients (Chio et al., 2009b). La SLA est généralement classifiée en deux formes cliniques principales qui se distinguent principalement par l'importance de la dégénérescence motoneuronale au sein de la moelle épinière et l'étendue des déficits moteurs observables. Il s'agit de la forme à début bulbaire et la forme à début spinale. D'autres formes cliniques plus rares sont également présentes (Couratier et al., 2014), dont les subtilités ne seront pas abordées dans la présente introduction.

### **1.1.2.1 Forme bulbaire**

La forme de SLA débutant par des symptômes bulbaires implique une atteinte des muscles respiratoires, des muscles du larynx, pharynx, de la trachée et du visage. Les symptômes vont inclure une difficulté à avaler, une prononciation difficile ainsi que des

difficultés d'élocution. Des troubles respiratoires apparaîtront progressivement, incluant par exemple un souffle court et un essoufflement (Couratier et al., 2014; Hardiman et al., 2011). Il est possible qu'une personne atteinte de SLA développe d'abord les premiers symptômes au niveau bulbaire, mais présente par la suite une évolution vers une forme spinale complète et l'apparition des déficits moteurs des membres supérieurs et inférieurs. Parfois, cette forme n'évolue pas vers une atteinte des membres supérieurs et inférieurs et ne cause pas de paralysie progressive des bras et des jambes, contrairement à la forme spinale typique. Lorsqu'il s'agit de la forme purement bulbaire, il y a des signes clairs d'atteinte des MNC mais également des MNP dans une moindre mesure : ceux-ci sont en effet restreints aux muscles respiratoires, du visage et de la mâchoire. Cette forme touche plus souvent les femmes et est associée à un pronostic plus favorable que celui de la forme complète (Burrell et al., 2011).

### **1.1.2.2 Forme spinale**

Dans les cas de SLA où les premiers symptômes sont spinaux, une dégénérescence de tous les neurones moteurs corticaux et spinaux est observée, qui se manifeste par une paralysie progressive de tous les muscles du corps humain, à l'exception du noyau d'Onuf et de muscles oculomoteurs qui sont relativement préservés jusque dans les derniers stades (Eisen et al., 1992). Elle comprend la forme à début brachial et celle débutant au membre inférieur (Couratier et al., 2014), en référence au site d'apparition des premiers symptômes. L'atteinte est en général d'abord unilatérale. Les patients atteints présentent une difficulté à marcher, à s'habiller, une faiblesse musculaire progressive, sans atteinte toutefois aux nerfs sensitifs, bien que des travaux récents montrent que des déficits sensoriels sont bel et bien présents dans la SLA et ont été sous-estimés (Iglesias et al., 2015). Il y a également apparition progressive de symptômes bulbaires tels qu'une difficulté d'élocution, une difficulté à manger, à avaler, ainsi qu'une faiblesse respiratoire.

### 1.1.3 Diagnostic

Le diagnostic de SLA est difficile à poser en général puisqu'il n'existe point de tests ou biomarqueurs spécifiques qui puissent certifier hors de tout doute la présence de cette maladie (Hardiman et al., 2011; Kiernan et al., 2011). Les critères spécifiques utilisés pour effectuer un diagnostic de SLA ont été formulés en 1994 (Brooks, 1994), et ont été révisés en 1998 pour correspondre davantage à la réalité clinique (Brooks et al., 2000). Il s'agit en général d'un diagnostic d'exclusion d'autres affections neurologiques puisqu'il importe d'éliminer d'abord toutes les autres maladies neurologiques qui impliquent également des atteintes motoneuronales qui pourrait engendrer une symptomatologie similaire. Par exemple, un diagnostic différentiel doit être établi avec d'autres affections telles que la sclérose en plaque, la sclérose latérale primaire, l'atrophie musculaire progressive et la paralysie cérébrale bulbaire progressive qui présentent en général des atteintes plus focales des MNC ou des MNP (Krivickas, 2003). Dans les cas d'atrophie musculaire progressive, qui évolue dans 20% des cas vers une SLA, il importe d'attendre 3 ou 4 années avant de poser un diagnostic définitif (Hardiman et al., 2011). De plus, les premiers signes cliniques de la maladie étant en général partagés par de nombreuses maladies variées et très peu spécifiques, comme par exemple la faiblesse musculaire, des troubles de la mobilité, la dyspnée et la dysphagie, il s'ensuit une lenteur accrue pour poser un diagnostic approprié. En moyenne 9 à 15 mois s'écoulent ainsi entre la première consultation avec un médecin et le diagnostic de SLA (Chio, 1999). Les personnes présentant un tableau clinique avec détérioration rapide reçoivent en général le diagnostic plus vite que ceux dont la maladie progresse lentement, en raison de l'étendue et de la gravité des symptômes et l'atteinte évidente de multiple segments spinaux et de déficits des MNC et MNP (Hardiman et al., 2011).

Bien qu'aucun test spécifique ne puisse offrir un diagnostic rapide et définitif de SLA, plusieurs examens et outils diagnostiques disponibles peuvent aider l'équipe médicale à poser un diagnostic adéquat. Tout d'abord, un examen neurologique incluant des tests électrophysiologiques peut permettre de mettre en lumière l'atteinte musculaire et permettre la discrimination avec d'autres troubles neurologiques semblables (de Carvalho et al., 2008;

Joyce and Carter, 2013). De plus, des critères électrophysiologiques sont maintenant inclus dans la révision des critères diagnostiques de la SLA (Brooks et al., 2000). Des biopsies, des tests immunologiques, des tests hormonaux et des techniques d'imagerie cérébrale peuvent également être d'une grande utilité pour le diagnostic différentiel avec d'autres désordres de la JNM ou des MN (Kiernan et al., 2011). Comme une certaine proportion des cas observés peut être attribuable à une mutation génétique, des tests génétiques vont se révéler utiles et permettre d'identifier la cause précise et poser un diagnostic certain de SLA dans près de 5% des cas (Hardiman et al., 2011).

### **1.1.4 Étiologie**

L'étiologie de la SLA n'est toujours pas connue de source sûre, bien que de nombreuses hypothèses aient été avancées à ce sujet. Environ 10% des cas sont explicables par une mutation génétique, alors que 90% des cas apparaissant de manière sporadique et n'ont ainsi pas d'explication connue (Rowland and Shneider, 2001). Des hypothèses multiples ont été avancées pour expliquer l'apparition de ce trouble neurologique, notamment des facteurs environnementaux variés tels que l'exposition aux produits chimiques, le tabagisme, les champs électromagnétiques, l'occupation, la pratique intensive de sport et bien entendu des facteurs génétiques.

#### **1.1.4.1 Facteurs environnementaux**

Des études épidémiologiques ont mis en lumière les corrélations existant entre diverses variables environnementales comme l'exposition aux métaux lourds tels que le mercure et le plomb (Johnson and Atchison, 2009; Kamel et al., 2005; Kamel et al., 2002; McGuire et al., 1997), aux produits chimiques toxiques (Weisskopf et al., 2009), aux pesticides (Kang et al., 2014; Malek et al., 2012) ainsi que la consommation de tabac (Kamel et al., 1999; Weisskopf and Ascherio, 2009). Le lien le plus puissant statistiquement semble être observable avec le tabac, mais certains détracteurs remettent en doute la méthodologie et les conclusions tirées

dans ces études. De plus, certaines occupations et professions semblent être associées dans la littérature à un risque accru de développer la SLA pour un individu exerçant cette fonction. Par exemple, les vétérans de la Guerre du Golf de l'armée américaine ont une fréquence doublée d'occurrence de la maladie (Horner et al., 2008; Miranda et al., 2008) ainsi que les militaires en tant que groupe précis (Beard and Kamel, 2015). L'exposition aux champs électromagnétiques de basse fréquence dans le cadre du travail est également associé avec une incidence accrue de SLA (Juntas-Morales et al., 2014; Zhou et al., 2012) Dans le cas des agriculteurs, le risque serait accru seulement en présence d'exposition antérieure aux pesticides. Les joueurs de soccer seraient également particulièrement à risque. Ainsi, il a été récemment démontré qu'une équipe de soccer d'Italie présentait une incidence beaucoup plus élevée que la normale de SLA, et des analyses approfondies suggèrent que le risque pourrait être spécifique à ce sport précis (Chio et al., 2009a; Chio et al., 2008b). Il n'est pas clair si l'activité physique intensive en elle-même est aussi au banc des accusés, puisque des études épidémiologiques contradictoires indiquent un rôle soit bénéfique (Pupillo et al., 2014), soit une absence de risque associé (Hamidou et al., 2014), ou encore un risque accru de développer la SLA (Beghi et al., 2010).

La délimitation précise de la maladie dans certaines aires géographiques (Boumediene et al., 2011; Caller et al., 2013; Caller et al., 2012; Cronin et al., 2007) donnent à penser qu'une interaction avec des facteurs environnementaux puissent s'exercer dans certains cas. Par exemple, une incidence augmentée de la maladie, de même que diverses pathologies connexes telles que démence frontotemporale et le Parkinson a été rapportée dès 1945 sur une île du Pacifique, l'île de Guam. En 1954, l'incidence de la maladie était de 50 à 100 fois supérieure à la normale (Mulder and Kurland, 1987). Une des explications avancées pour expliquer cet étrange accroissement du nombre de cas d'affection neurologiques est la présence d'une toxine dans les graines de cyade de la farine faisant partie intégrante de la diète alimentaire des habitants de Guam (Banack and Cox, 2003; Cox and Sacks, 2002; Spencer et al., 1986). Cette toxine, la Beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA), provient d'une cyanobactérie qui est présente de manière ubiquitaire dans les étangs et les déserts, donc susceptible de contaminer la chaîne alimentaire dans plusieurs endroits différents. Bien que certains remettent en doute la force des évidences épidémiologiques en faveur d'une toxicité



de la toxine qui causerait la SLA (Caller et al., 2012), de hauts niveaux de BMAA se retrouvent ainsi dans le cerveau des patients de Chamorro, tout comme dans celui de plusieurs patients sporadiques atteints de la maladie en Europe également (Juntas-Morales et al., 2014) ou encore aux États-Unis (Pablo et al., 2009). L'incertitude et la controverse demeure toutefois encore aujourd'hui concernant cette toxine et les facteurs environnementaux mentionnés précédemment, compte tenu de la difficulté d'isoler adéquatement les variables en cause dans ces études épidémiologiques qui rend périlleux l'établissement de liens causals directs avec la SLA.

#### **1.1.4 Mutations génétiques**

La première cause génétique de la SLA identifiée fût une mutation de l'enzyme Cu/Zn superoxyde dismutase SOD1 (Rosen et al., 1993). Cette mutation, causant 20% des cas héréditaires de SLA (Deng et al., 1993; Rosen et al., 1993) fût longtemps la seule connue. De nombreuses mutations génétiques ont par la suite été découvertes dans les années 2000, provenant de gènes moins fréquents causant également la symptomatologie de la SLA, telle qu'une mutation dans le gène VAPB impliqué dans le trafic de vésicules (Nishimura et al., 2004) .

S'ensuivirent l'identification de gènes familiaux responsables d'un faible pourcentage des cas familiaux, notamment les mutations de protéines TAR DBP de 43kD (TDP-43) (Kabashi et al., 2008; Liscic et al., 2008; Neumann et al., 2006; Sreedharan et al., 2008) tout comme Fused in Sarcoma (TLS/Fus) (Kwiatkowski et al., 2009), toutes deux des molécules impliqués dans le métabolisme des acides ribonucléiques (ARN). Les mutations des gènes de l'optineurin (OPTN) (Maruyama et al., 2010), de la protéine contenant de la valosin (VCP) (Johnson et al., 2010) et l'Ubiquilin 2 (UBQLN2) (Deng et al., 2011) ont ensuite été identifiées subséquentement comme causant des formes familiales de SLA très peu fréquentes.

En 2011, une découverte a amené un regain d'intérêt dans le domaine de la génétique de la SLA puisque la mutation génétique identifiée expliquerait environ 40% des cas familiaux de SLA en plus de 20% des cas familiaux de démence frontotemporale (Majounie et al., 2012)

Cette mutation touchant le chromosome 9 implique le gène Chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011) permet enfin de mieux comprendre la présence de ces 2 pathologies de manière concomitantes au sein de certaines familles et même certains patients. Elle consiste en une expansion répétée, un nombre variable de fois, d'une séquence hexanucléotide située dans une région non codante du gène (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Murray et al., 2011).

À ce jour, plus de 150 mutations identifiées sur près de 24 gènes différents, causant un portrait clinique assez caractéristique mais très variable qui se retrouvent chez les patients atteints (Renton et al., 2014; Tortelli et al., 2013). En effet, l'âge d'apparition de la maladie, la vitesse de progression ainsi que le premier site d'atteinte peut différer passablement, pour ne nommer que ces facteurs. La variabilité phénotypique est donc très grande, certaines formes étant même associées à la démence frontotemporale ou encore à des syndromes concomitants variés. Des mutations précises engendrent des formes beaucoup plus agressives que d'autres, telles que la mutation SOD1A4V qui est la plus fréquente des mutations SOD1 en Amérique du Nord et qui cause habituellement la mort dans l'année suivant le diagnostic des personnes atteintes (Cudkowicz et al., 1997). D'autres mutations sont caractérisées par une évolution beaucoup plus lente, telle que la mutation SOD1D90A qui amène une progression de la maladie sur plusieurs années, la détresse respiratoire n'apparaissant qu'après plus d'une décennie (Andersen et al., 1996) .

## **1.2 Enzyme Superoxyde dismutase**

L'enzyme superoxyde dismutase est une enzyme présente de manière ubiquitaire dans tous les tissus de l'organisme, hautement conservé durant l'évolution. Elle est extrêmement abondante dans le système nerveux central (SNC), représentant en effet de 1 à 2% du total des protéines solubles au sein de celui-ci (Pardo et al., 1995) Présentes notamment dans le cerveau et la moelle épinière, on la retrouve dans toutes sortes de types cellulaires : les neurones, les cellule gliales, les cellules musculaires, etc. Il existe trois isoenzymes SOD chez les mammifères : la forme cytosolique SOD1 (CuZn-SOD), la forme mitochondriale (SOD2) et la

forme sécrétée de manière extracellulaire (SOD3). Dans le cadre de cette introduction, nous nous concentrerons sur l'analyse du rôle et de la fonction de l'enzyme SOD1, qui est la forme touchée par les mutations causant la SLA (Rosen, 1993).

### **1.2.1 Fonctions et propriétés de l'enzyme**

La principale fonction connue attribuée à l'enzyme SOD1 est un rôle antioxydant, la protéine étant impliquée dans la transformation des espèces réactives d'oxygène pour limiter l'action du stress oxydatif sur l'organisme. Ainsi, la protéine SOD1 réalise la conversion des divers radicaux dont l'anion superoxide ( $O_2^-$ ) en eau et en peroxyde d'hydrogène (Fridovich, 1986a, b, 1995). Cette neutralisation empêche la réaction chimique délétère de se produire entre  $O_2^-$  et les agents peroxides retrouvés dans la cellule, qui produit un oxydant capable d'attaquer n'importe quel type cellulaire, particulièrement l'ADN (Fridovich, 1995). Cette enzyme semble également importante en cas de blessure puisqu'elle semble limiter l'étendue des dommages oxydatifs exercés sur l'organisme, comme en témoigne la plus grande mort neuronale observée en cas de lésion chez des souris déficientes pour cette forme de l'enzyme (Reaume et al., 1996). Cependant, il semble que l'abondance de cette protéine au sein du SNC ne peut se justifier par cette seule fonction dans le système REDOX : il apparaît en effet dans un modèle de levure que moins de 1% seulement de la quantité totale de SOD1 soit nécessaire pour l'accomplir (Reddi and Culotta, 2013). Cette disparité entre la quantité totale de SOD1 et celle nécessaire pour remplir son rôle présumé laisse soupçonner la présence d'autres fonctions encore inconnues de l'enzyme d'importance égale ou même plus élevée pour le fonctionnement de l'organisme (Bunton-Stasyshyn et al., 2014).

En plus de son rôle prédominant dans la neutralisation de l'anion superoxyde, CuZnSOD peut catalyser la nitration des résidus tyrosyl par les peroxynitrites et exercer une activité peroxidase non-spécifique (Fridovich, 1995). Des fonctions alternatives avancées pour l'enzyme SOD1 comprennent par exemple un rôle dans la transcription des gènes, de récentes évidences ayant démontré que SOD1 peut dans certaines circonstances agir en tant que facteur

de transcription en migrant à l'intérieur du noyau cellulaire pour ensuite lier des promoteurs régulant l'expression de gènes de résistance au stress oxydatif (Zhang et al., 2007).

### **1.2.2 Mécanismes de toxicité de l'enzyme SOD1 dans la SLA**

La présence d'une mutation génétique du gène codant l'enzyme SOD1 est responsable d'environ 12% des cas héréditaires de SLA et 1% des cas sporadiques (Chio et al., 2008a). Le développement de modèles animaux a permis de mieux caractériser la séquence d'événements pathologiques se produisant en présence d'une mutation de l'enzyme CuZnSOD. Plusieurs mécanismes différents ont été avancés pour expliquer la toxicité de cette protéine mutante, la plupart tentant d'expliquer la pathologie par un gain de fonction toxique encore inexpliquée de l'enzyme qui mènerait progressivement à la dégénération des neurones moteurs corticaux et spinaux. Des altérations cellulaires diverses sont ainsi bel et bien présentes chez les personnes atteintes de SLA familiale et les modèles animaux mutants SOD1. Cette section de l'introduction permettra de se familiariser avec les divers modèles SOD1 et les rôles que joue cette mutation dans le développement de la pathologie de la SLA, sans toutefois nécessairement faire un tour exhaustif de la question.

#### **1.2.2.1 Modèles murins SOD1**

Tel que mentionné précédemment, la première mutation génétique connue causant la SLA fut découverte il y a plus de 20 ans, et a donc donné naissance à de nombreux modèles animaux mutants SOD1 dont la pathophysiologie et la progression de la maladie sont désormais assez bien caractérisée. Le développement de ces souches de mutants SOD1 ont permis d'en apprendre beaucoup plus et constituent une immense ressource de données scientifiques de qualité concernant les effets de la mutation SOD1. Seuls les modèles murins, plus pertinents à l'étude en cause, seront abordés dans la présente section.

Tout d'abord, la souche de souris mutante SOD1<sup>G93A</sup> a été la première à voir le jour et fût considérée comme ayant un portrait clinique semblable à l'humain et des similarités avec

la progression humaine de la maladie, en faisant donc un modèle adéquat d'étude (Gurney et al., 1994) qui à ce jour demeure celui ayant engendré la littérature la plus prolifique et demeure la mieux caractérisée. Cette mutation en position 93 d'une glycine contre une alanine cause une paralysie progressive très rapide, les souris décédant à 5-6 mois d'âge seulement (Gurney et al., 1994). Conséquemment à une surexpression de la protéine humaine mutée de plus de 20 fois chez les souris transgéniques à haute copie, la maladie subit donc un développement accéléré, entraînant des symptômes moteurs agressifs et une dégénérescence rapide des motoneurons. Toutefois, une partie des effets observés pourrait être aggravée par une association artificielle de protéines SOD1 mutantes sur les mitochondries causées par la surexpression extrême de l'enzyme et ne pas refléter adéquatement le processus pathophysiologique de la SLA (Bergemalm et al., 2006). Une autre variante, moins utilisée toutefois, exprimant un faible nombre de copies de la mutation SOD1<sup>G93A</sup>, a une durée de vie plus longue (6 à 7 mois) (Dal Canto and Gurney, 1997).

Pour continuer dans la même veine, un modèle dont le développement de la maladie est plus progressif est celui de la SOD1<sup>G37R</sup>, qui amène une surexpression de 2 à 5 fois de la protéine mutée humaine SOD1 dans le cerveau et la moelle épinière (Wong et al., 1995). La progression de la maladie se déroule sur une période beaucoup plus longue dans ce modèle, mimant de manière plus physiologique l'évolution temporelle de la pathologie chez l'humain. Les animaux développent les premiers symptômes de paralysie après quelques mois et décèdent parfois plus d'un an, dépendamment de la lignée et du niveau de surexpression de l'enzyme (Wong et al., 1995). Les anomalies cellulaires répertoriées chez certains de ces mutants comprennent par exemple une dégénérescence des mitochondries et l'apparition de vacuoles à multiples membranes au sein des axones et des dendrites, qui proviennent probablement des mitochondries dégénérées (Wong et al., 1995).

D'autres modèles encore comprennent la SOD1<sup>G127X</sup> (Jonsson et al., 2004), la SOD1<sup>G86R</sup> (gène muté murin) et la SOD1<sup>G85R</sup> (Bruijn et al., 1997). Une des particularités de ce dernier modèle est l'inactivité de l'enzyme SOD1 causée par la mutation. L'évolution de la pathologie dure entre 7 et 9 mois pour la forme mutante homozygote et 10 à 12 mois pour la forme hétérozygote (Williamson and Cleveland, 1999). Dans ces modèles, on observe une diminution du nombre de cellules de la corne ventrale de la moelle épinière, la présence de

nombreux corps de Lewi ubiquitinés, un enflement de l'axone et de l'astrogliose, ce qui en fait un modèle très semblable à la forme familiale humaine de la SLA (Jonsson et al., 2004). La variabilité de l'activité enzymatique chez les différents mutants et son influence sur le phénotype moteur sera d'ailleurs abordée dans la section ci-dessous.

### **1.2.2.2 Activité enzymatique**

Malgré le fait qu'elles causent toutes la maladie, les protéines SOD1 mutées conservent un taux d'activité variable de l'enzyme par rapport à la forme naturelle WT. Il semblerait en effet que cette dégénérescence des motoneurones engendrée par des mutations variées de la SOD1 ne soit pas directement reliée à une perte de fonction antioxydante (Bruijn et al., 1998). Ainsi, alors que l'activité enzymatique superoxyde dismutase est parfois complètement conservée (ex. G37R), elle est dans d'autres cas carrément absente (ex. G85R) chez les modèles murins porteurs de la mutation (Borchelt et al., 1994). Les mutants démontrent ainsi une variabilité certaine dans le taux d'activité enzymatique qui ne peut donc pas expliquer à elle seule l'apparition des symptômes dans tous les cas, sans compter qu'il ne semble pas y avoir de corrélation de la vitesse de progression ou l'âge d'apparition des premiers symptômes et le niveau relatif d'activité de l'enzyme SOD1 (Jonsson et al., 2006). De plus, les animaux SOD1<sup>-/-</sup> ne développent pas de maladie neurodégénérative ni de symptômes moteurs d'aucune sorte malgré le fait qu'ils présentent une vulnérabilité accrue face aux dommages neuronaux (Reaume et al., 1996).

Bien que l'absence de fonction antioxydante ne semble pas causer la pathogénicité directement, des altérations diverses du fonctionnement de l'enzyme ont été mis en lumière, telles qu'une altération du métabolisme oxydatif de l'enzyme (Wiedau-Pazos et al., 1996) et un relâchement aberrant de Cuivre (Nagano et al., 1999). Cependant, la réduction de l'incorporation du cuivre sur la SOD1, n'a aucun effet sur la progression de la maladie (Subramaniam et al., 2002). En résumé, un certain gain de fonction toxique semble se produire chez tous les mutants de manière indépendante de l'activité enzymatique, qui toutefois montre tout de même certaines évidences d'altérations fonctionnelle et des problèmes reliés à l'activité SOD1.

### 1.2.2.3 Agrégation

Les mutations de la protéine SOD1 semblent influencer sa propension à l'agrégation (Chattopadhyay and Valentine, 2009; Furukawa and O'Halloran, 2005; Okado-Matsumoto et al., 2000; Stathopoulos et al., 2003), puisqu'elle cause un changement de structure de l'enzyme et occasionne des problèmes dans le repliement correct de la protéine. Les protéines mal repliées vont ainsi exposer des zones normalement inaccessibles et par conséquent s'accoler plus facilement les unes contre les autres. La principale conséquence engendrée par cette nouvelle propriété est la formation d'agrégats cytoplasmiques toxiques contenant entre autres la protéine mutante et de l'ubiquitine au sein des neurones moteurs et des astrocytes, observable chez les humains autant que chez divers modèles animaux (Bruijn et al., 1997; Gurney et al., 1994; Stieber et al., 2000; Wong et al., 1995). Malgré la toxicité présumée de ces agrégats, une stabilité réduite de l'enzyme et une propension accrue à former des agrégats solubles ne semblent pas expliquer directement la durée des symptômes et la progression de la pathologie chez les animaux mutants (Vassall et al., 2011). Il faut cependant noter que les patients montrant un déroulement accéléré de la maladie sont associés à des mutations caractérisées par une haute propension à induire une agrégation *in vitro* (Prudencio et al., 2009).

Des évidences diverses concernant la contagiosité de ces agrégats dans diverses maladies neurologiques et des modèles de cultures cellulaires *in vitro* ont amené certains à faire une analogie avec les maladies à prion dans lesquelles une protéine mal repliée peut ainsi causer le repliement d'autres protéines normales non mutées et amener une transmission de l'aberration structurale d'une cellule à une autre (Grad and Cashman, 2014; Grad et al., 2015; Grad et al., 2014; Polymenidou and Cleveland, 2011). Il apparaîtrait ainsi que la présence d'enzymes WT-hSOD1 puisse augmenter la toxicité d'enzyme SOD1 mutées par des mécanismes directs et indirects chez des modèles de souris bigéniques (Xu et al., 2015), par exemple en accélérant l'apparition des premiers symptômes de la SLA via une interaction avec les enzymes mutées qui amène les enzymes WT à adopter une conformation mal repliée. En effet, l'intensité de l'effet des enzymes WT-hSOD1 sur le développement de la maladie

était en corrélation directe avec la force des interactions entre les enzymes WT et SOD1 sous leur forme soluble (Xu et al., 2015). Il s'agit donc d'une explication qui est également avancée pour expliquer les cas sporadiques de SLA, mais qui nécessite cependant d'être appuyé par plus d'évidences cliniques sur le terrain.

#### **1.2.2.4 Excitotoxicité**

L'excitotoxicité est depuis longtemps considéré comme une explication potentielle de la toxicité observée dans le cas des mutations SOD1. En effet, une hyperexcitabilité du cortex moteur peut mener à une activité excitatrice accrue qui peut amener la dégénérescence des MN via une toxicité induite par le glutamate. Une activation augmentée des récepteurs postsynaptique glutamatergiques AMPA cause ainsi une dégénération neuronale médiée par des voies de signalisation cellulaire dépendantes du calcium (Regan et al., 1995). En accord avec cette hypothèse, une hyperexcitabilité marquée du cortex moteur a été mise en lumière dans la SLA, qui serait liée à une diminution de l'activité gabaergique intracorticale (Caramia et al., 2000; Vucic et al., 2011) et précéderait la venue des symptômes des MNP (Menon et al., 2015). Des anomalies des canaux ioniques ont également été répertoriés chez les mutants, notamment la présence d'un courant sodique entrant persistant altéré chez les MN (Kuo et al., 2005; Pambo-Pambo et al., 2009), causant une augmentation de l'excitabilité des MN. Le Riluzole, le seul médicament approuvé à ce jour pour soigner la SLA, exercerait justement son effet en diminuant la transmission glutamatergique et en bloquant le courant sodique persistant (Amendola et al., 2007; Kuo et al., 2005).

La capacité intrinsèque réduite de tamponner le calcium dans les neurones moteurs, en amènent plusieurs à penser que ceux-ci sont extrêmement vulnérables aux menaces environnantes tels que l'excitotoxicité, qui pourrait être particulièrement délétère pour les MN dans la SLA. Ainsi, la SLA cause en plus diverses dysrégulations du métabolisme calcique mises en lumière dans les mitochondries particulièrement. Des anomalies des mitochondries et du métabolisme régulateur du calcium au sein de celles-ci semblent en effet présentes dans la SLA (Tradewell et al., 2011). Dans le même ordre d'idées, l'activité des complexes de la chaîne respiratoire des mitochondries est diminuée dans la chaîne respiratoire et des

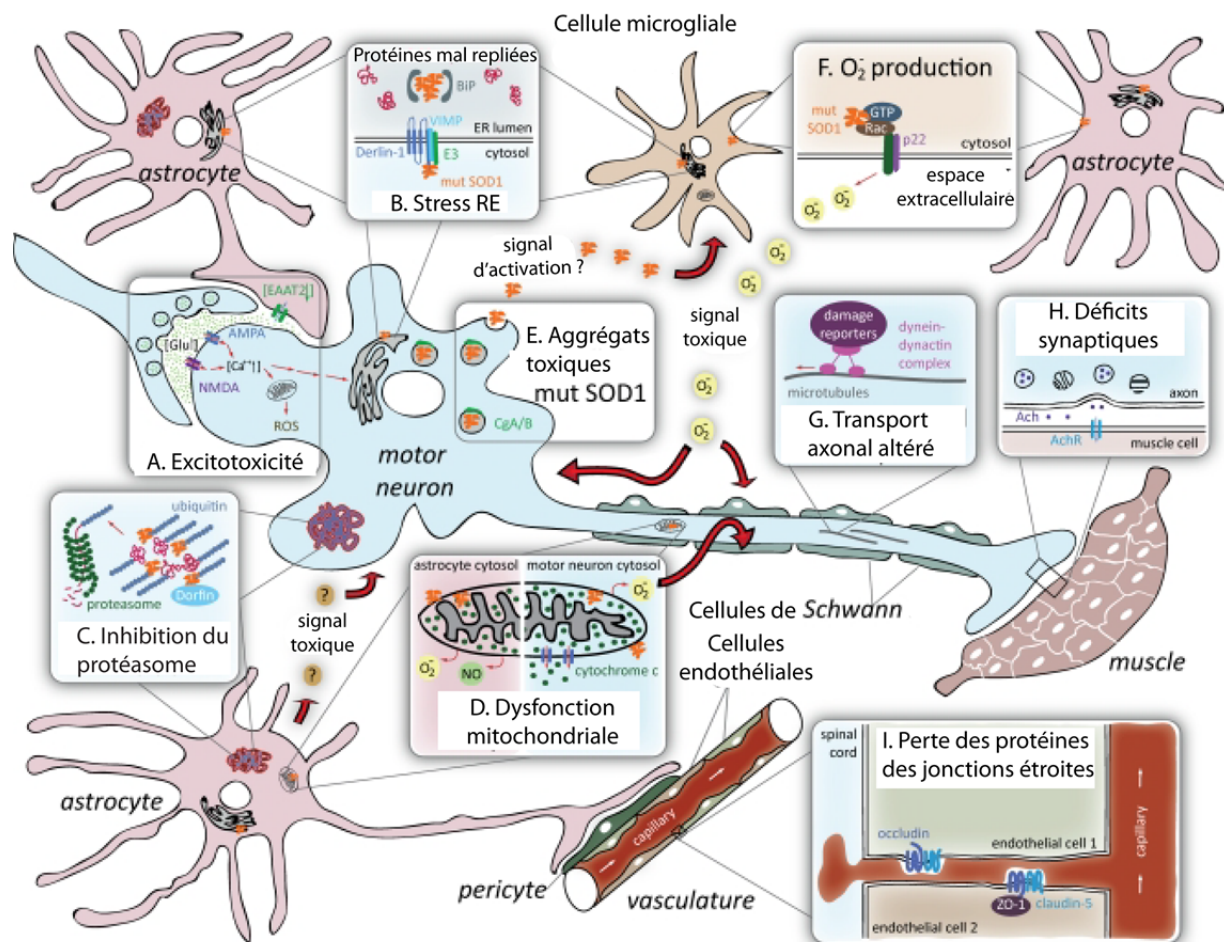


dommages à l'ADN mitochondriale sont visibles dans la moelle épinière de patients atteints de SLA (Wiedemann et al., 2002). Les enzymes mutées s'accumulent à la surface des mitochondries (Vande Velde et al., 2008), et des mitochondries anormales, dilatées, contenant des vacuoles ont été observées chez l'humain et le modèle animal SOD1 (Dal Canto and Gurney, 1997; Wong et al., 1995). Ces déficits précoces du métabolisme respiratoire et énergétique diminuent considérablement la capacité du MN à survivre aux diverses menaces et pourraient influencer la capacité du neurone à survivre dans un environnement excitotoxique. Une étude a toutefois brillamment démontré qu'en l'absence du gène de la cyclophiline D, une molécule régulatrice du tamponnage du  $\text{Ca}^{++}$  par les mitochondries, une augmentation à long terme de la capacité des mitochondries à tamponner le  $\text{Ca}^{++}$  est observée chez les souris SOD1, associée à une hausse de la synthèse de l'ATP mitochondriale, une diminution des agrégats SOD1, une diminution de la mort des neurones moteurs ainsi qu'une diminution du gonflement des mitochondries (Parone et al., 2013). Cependant, malgré tous ces effets bénéfiques, aucun effet sur la progression de la maladie et la survie, la dénervation des JNMs et la dégénérescence des axones moteurs n'ayant pu être évitées (Parone et al., 2013). Il apparaît donc qu'une capacité réduite de tamponner le  $\text{Ca}^{++}$  des mitochondries, qui pourrait représenter à prime abord une hypothèse plausible de la maladie, ne semble cependant pas à même d'expliquer l'apparition de la maladie.

#### **1.2.2.5 Le rôle des cellules gliales dans la SLA**

Chez les modèles animaux autant que chez l'humain, il semble survenir un étrange dialogue impliquant de multiples partenaires qui va influencer la dégénération des MN dans la SLA, à tout le moins lorsque celle-ci est causée par la mutation SOD1 (voir figure 1.1). Ceux-ci ne sont effectivement pas les seuls à présenter des altérations durant la maladie et subissent l'influence d'autres types cellulaires, notamment les cellules gliales, qui vont influencer la survenue et la progression de la maladie. La SLA est ainsi considérée comme étant une maladie qui n'affecte pas seulement les cellules MN de manière indépendante (non-cell autonomous) (Boillee et al., 2006a), mais provoque en plus une suite d'événements toxiques et d'altérations fonctionnelles chez les cellules gliales environnantes, qui vont à leur tour

influencer le destin des MN. La présence de la mutation dans les MN n'est cependant pas suffisante à elle seule pour causer la maladie. En effet, d'autres études comprenant divers modèles de chimères avec proportion variable de cellules WT entourant des neurones malades ont pu démontrer hors de tout doute le rôle non négligeable des cellules environnantes dans l'évolution de la pathologie, du moins dans le cas de la forme causée par la mutation SOD1 (Clement et al., 2003). En effet, des évidences provenant d'étude ayant effectué une expression et/ou une ablation sélective de la protéine mutante montrent que la présence de la protéine mutante dans les MN affecte le plutôt le début de la maladie, alors que sa présence au sein des astrocytes ainsi que de la microglie influence de manière déterminante la progression de la SLA (Boillee et al., 2006b; Yamanaka et al., 2008b). Bien que la présence de la mutation au sein des motoneurones semble être un facteur essentiel au développement de la maladie, des types cellulaires autres que les neurones moteurs et les oligodendrocytes influenceraient l'âge d'apparition du début de la maladie (Yamanaka et al., 2008a). L'excision de la mutation dans les oligodendrocytes a par ailleurs permis de retarder la survenue des premiers symptômes de 50% (jours) (Kang et al., 2013). De plus, une claire astroglie et une inflammation de la microglie est également observé chez des patients SOD1 et même chez des cas sporadiques.



**Figure 1.1** Mécanismes possibles de toxicité de la mutation *SOD1* impliquant le motoneurone et les cellules gliales dans la SLA. Représentation schématique des divers effets de la protéine mutante *SOD1* résultant des interactions complexes entre le neurone moteur, les astrocytes et la microglie. **A**, Excitotoxicité glutamatergique causée par une incapacité à enlever rapidement le glutamate extracellulaire dûe à une dysfonction des transporteurs EAAT2 des astrocytes. Il en résulte une activation accrue des récepteurs AMPA et NMDA et une augmentation du calcium intracellulaire. **B**, Activation du système de stress du réticulum endoplasmique (RE) causée par la présence de protéines *SOD1* mal repliées. **C**, Inhibition du fonctionnement du protéasome causée par une abondance de protéines *SOD1* ubiquitinées. **D**, Dysfonction des mitochondries, accumulation de protéines *SOD1* sur la surface qui amène la libération de cytochrome c dans le MN et des perturbations de la respiration cellulaire et du métabolisme calcique. **E**, Les protéines mutées *SOD1* toxiques peuvent être sécrétées de manière

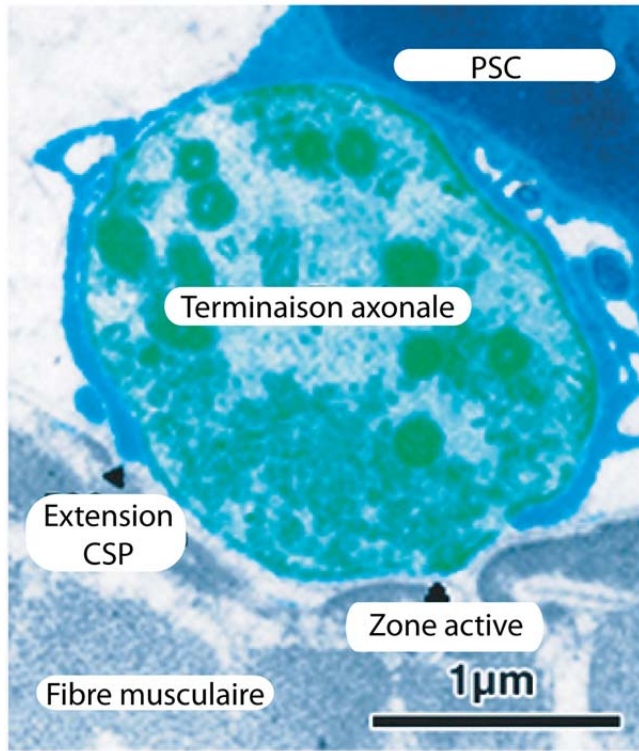
extracellulaire par les MN et les astrocytes et causer des dommages aux cellules environnantes. **F**, Production de l'anion superoxide est accrue dans la maladie dans les microglies et les astrocytes, ce qui peut en retour endommager les neurones environnants. **G**, un transport axonal réduit semble caractériser la SLA. **H**, Des altérations synaptiques d'une stagnation des vésicules ou d'une rétraction de l'axone chez certains MN ont été rapportées. **I**, Dans les capillaires des cellules endothéliales, la perte des jonctions étroites peut mener à une perturbation de la barrière hématoencéphalique ou encore à des microhémorragies. Adapté de (Ilieva et al., 2009). Droit de reproduction à des fins non commerciales inclus dans la license Creative Commons Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported License.

## 1.3 La jonction neuromusculaire

La jonction neuromusculaire (JNM) est une synapse du système nerveux périphérique qui unit l'axone d'un neurone moteur spinale (MNP) à une fibre musculaire. D'une importance primordiale en raison de son rôle dans l'activation musculaire et l'accomplissement du mouvement volontaire des muscles squelettiques, cette synapse est composée de trois éléments principaux: la terminaison nerveuse de l'axone moteur, les récepteurs postsynaptiques situés sur la fibre musculaire et les cellules gliales non myélinisantes de la JNM, les cellules de Schwann Périssynaptiques (CSP) (voir figure 1.2). Bien que la vision traditionnelle de la JNM inclue généralement seulement l'élément présynaptique, la fente synaptique et l'élément postsynaptique (Fagerlund and Eriksson, 2009), des évidences de plus en plus nombreuses de la participation active des astrocytes et des CSPs dans le contrôle de la neurotransmission ont amené le concept de synapse tripartite dans le système nerveux central et à la JNM (Araque et al., 2014; Araque et al., 1999; Auld and Robitaille, 2003). Relativement isolée du reste du système nerveux, l'accessibilité de la JNM et la facilité avec laquelle il est ainsi possible d'isoler plus facilement les variables en cause en fait un modèle intéressant pour étudier la transmission synaptique ainsi que les diverses formes de plasticité synaptique. La JNM représente également un modèle plus que pertinent pour l'étude des troubles neurologiques impliquant des atteintes de la motricité susceptibles

d'affecter la neurotransmission. Ces phénomènes en apparence simples que sont les mouvements volontaires nécessitent en effet nombre d'étapes précises pour mener aux mouvements volontaires que nous exerçons tous les jours de manière routinière. Il importe donc d'en étudier les caractéristiques à la JNM afin de mieux comprendre la nature et le rôle

que celle-ci joue dans la génération du mouvement et de la contraction musculaire.



**Figure 1.2** *Morphologie de la jonction neuromusculaire.* Visualisation en microscopie électronique d'une JNM de grenouille, incluant la terminaison nerveuse, la cellule de Schwann pérисynaptique (CSP) et la densité postsynaptique. Noter le nombre impressionnant de vésicules synaptiques (en vert) dans le compartiment présynaptique, spécialement face aux zones actives (flèche noire droite). Remarquer comment les CSPs envoient des extensions (flèche noire gauche) autour de la terminaison nerveuse, qui s'étendent jusque dans la fente synaptique. Tiré de (Auld and Robitaille, 2003), adapté de (Jahromi et al., 1992). Droits d'auteur et reproduction obtenus de Elsevier.

### **1.3.1 Élément présynaptique**

Chez les mammifères et les vertébrés les plus évolués, chaque fibre musculaire squelettique est généralement innervée par une seule terminaison axonale provenant d'un neurone moteur, bien qu'un même axone puisse quant à lui innerver plusieurs fibres musculaires. La terminaison axonale est ainsi l'endroit qui permettra le passage de l'information du neurone vers la fibre musculaire qui mènera éventuellement à la contraction musculaire.

#### **1.3.1.1 Structure générale**

À la jonction neuromusculaire, l'axone moteur perd sa gaine de myéline et forme de nombreux branchements afin de faire contact avec la fibre musculaire. On y retrouve entre autres une machinerie ultra spécialisée, notamment des protéines de régulation variées permettant la synthèse, l'exocytose et le recyclage de l'acétylcholine (ACh), puisque la JNM est une synapse cholinergique. Cependant, des récepteurs et des molécules intervenant dans la synthèse du glutamate seraient également présents à la JNM de vertébré, qui aurait toutefois un rôle modulateur sur la transmission synaptique (Pinard et al., 2003). Divers types de canaux calciques tapissent la membrane présynaptique, certains sensibles au voltage. En plus des canaux calciques, de nombreux types de canaux potassiques et purinergiques sont présents à la zone active.

#### **1.3.1.2 Zones actives et entrée calcique**

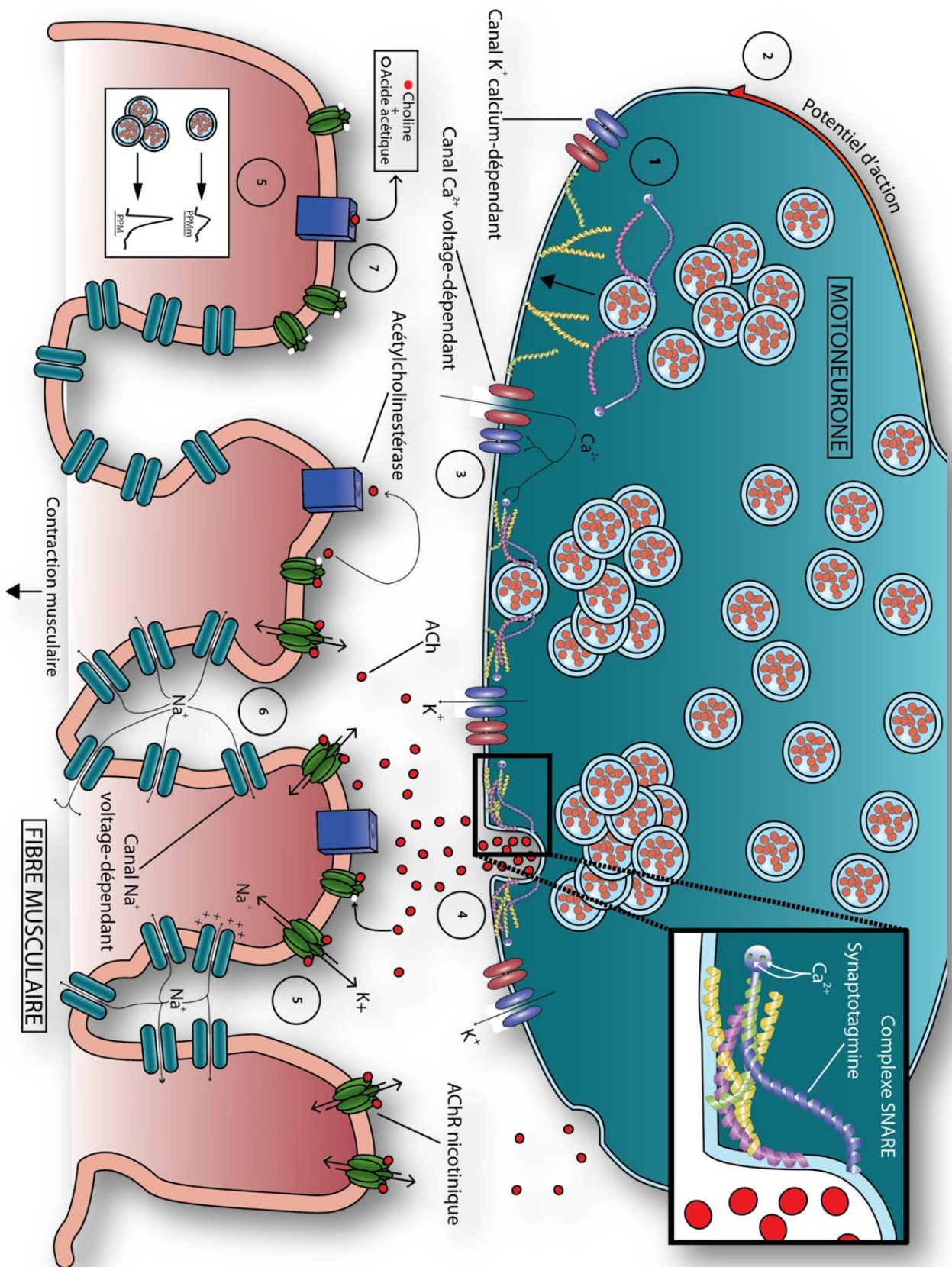
À l'intérieur du bouton terminal, il est possible d'observer de petites zones très denses où se produit la libération de neurotransmetteurs, reconnaissables en imagerie électronique par leur densité particulière, qu'on appelle des zones actives (Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1970). À ces endroits précis ultra spécialisés s'accrochent un grand nombre de vésicules contenant chacune de 5000 à 10000 molécules d'acétylcholine (Kuffler and Yoshikami, 1975),

prêtes à être larguées, ainsi qu'une série de canaux ioniques insérés dans la membrane. Des travaux à la JNM de grenouille ont d'ailleurs démontré que les canaux calciques dépendant du potentiel représentent à coup sûr certaines des particules intra membranaires qui sont observées au niveau des zones actives (Robitaille et al., 1990, 1993a). Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action dans l'axone qui provoque la dépolarisation du bouton terminal, la transmission synaptique à la JNM serait ainsi débiter par l'entrée de calcium via ces canaux calciques de type P/Q et N (Rosato Siri and Uchitel, 1999; Urbano et al., 2003). Ainsi, ce changement de potentiel local provoque l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendants qui résulte en un influx de calcium au sein du bouton terminal. Cette entrée de calcium sera également de première importance dans l'exocytose des vésicules contenant l'acétylcholine, rôle dont il sera discuté brièvement plus bas. Des canaux potassiques activés par le calcium feraient même partie des zones actives à proprement dit (Robitaille et al., 1993a; Robitaille et al., 1993b).

### **1.3.1.3 Exocytose et libération de neurotransmetteurs**

L'exocytose des vésicules synaptiques dans la fente synaptique représente une étape cruciale dans la libération de neurotransmetteurs (voir figure 1.3). En effet, comment l'augmentation temporaire de calcium au niveau local dans le bouton synaptique parvient-il à entraîner la libération de nombreuses vésicules remplies d'ACh bien alignées au cœur des zones actives? Plusieurs protéines semblent jouer un rôle important dans ce phénomène, telles que la synaptophysine, la syntagmine, la syntaxine et la protéine associée au synaptosome SNAP-25. Ces trois dernières molécules seraient ainsi responsables de l'attachement des vésicules à la membrane cellulaire en vue de l'exocytose. L'activation d'une quatrième molécule, la synaptotagmine, par l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  au sein du bouton terminal, va permettre la formation du complexe SNARE à l'aide des trois molécules précédemment décrites. Le complexe SNARE participera ensuite à la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique (Littleton et al., 1998). Ensuite, l'acétylcholine est larguée dans la fente synaptique où elle pourra exercer son action sur les récepteurs de la cellule musculaire (ainsi que ceux de la cellule gliale et de ses propres autorécepteurs).







**Figure 1.3** *Exocytose et transmission synaptique à la jonction neuromusculaire.* Représentation schématique séquentielle du processus d'exocytose de vésicules d'acétylcholine (ACh) dans la terminaison axonale jusqu'à la génération du potentiel de plaque motrice dans le compartiment postsynaptique, soit la fibre musculaire. **1**, Génération d'un potentiel d'action dans l'axone du neurone moteur, causée par la dépolarisation au-dessus du seuil des canaux sodiques voltages-dépendants. **2**, En parallèle, une vésicule se prépare à s'accoler à la membrane cellulaire pour être prête à être larguée. **3**, La dépolarisation au sein de la terminaison axonale permet l'ouverture des canaux  $\text{Ca}^{++}$  voltages-dépendants, qui laisseront entrer le calcium. **4**, L'entrée de calcium près des zones actives permet la formation du complexe SNARE et l'interaction des protéines-clés dans le processus d'exocytose, notamment la synaptotagmine (en mauve), ce qui permet la libération d'ACh dans la fente synaptique. **5**, La présence d'ACh dans la fente synaptique cause une activation des récepteurs nicotiniques, situés à la crête des replis de la densité postsynaptique. Cela cause une dépolarisation de la fibre musculaire via l'entrée de sodium et la génération d'un potentiel de plaque motrice (encadré à gauche), qui peut être miniature (correspondant à une seule vésicule libérée.) **6**, Lorsque la dépolarisation atteint le seuil de déclenchement du potentiel d'action musculaire, les canaux sodiques voltages-dépendants s'ouvrent et laissent entrer le  $\text{Na}^+$ , ce qui provoque éventuellement la contraction musculaire. **7**, L'ACh est éliminé de la fente synaptique via l'action de l'enzyme acétylcholinestérase, qui dégrade l'ACh en choline et en acide acétique. Les canaux potassiques sont responsables de la repolarisation de la fibre musculaire. PPM, potentiel de plaque motrice; PPMm, potentiel de plaque motrice miniature.

### 1.3.1.4 Contenu quantique

Le contenu quantique d'une JNM fait référence à la force relative de cette synapse, et correspond au nombre de vésicules relâchées pour chaque potentiel d'action dans le MN. On appelle potentiel de plaque motrice miniature (PPMm) l'amplitude moyenne des événements unitaires spontanés enregistrés, correspondant à la libération d'une vésicule. Lors de la stimulation du motoneurone produisant un potentiel d'action, un multiple entier de vésicules

seront relâchées, ce qui représente le contenu quantique. On la nomme relâche quantique, puisque chaque réponse est d'une amplitude correspondant à un multiple de la plus petite réponse observée (qui correspond par définition à une seule vésicule relâchée) (Del Castillo and Katz, 1954b; Katz, 1971). Il sera plus ou moins élevé en fonction de diverses propriétés relatives au motoneurone et à l'unité motrice, et provoque une dépolarisation au sein de la cellule musculaire plus ou moins grande correspondant au potentiel de plaque motrice (PPM). Des expériences datant des années 1950 ont d'ailleurs permis de mettre en lumière la méthode et surtout la fiabilité de diverses méthodes de calcul pour le déterminer. La méthode suggérée à l'époque implique de bloquer la contraction musculaire en limitant la quantité de calcium et/ou en augmentant la quantité de  $Mg^{++}$  dans la solution de Ringers's Rees physiologique dans laquelle la préparation musculaire baigne (Del Castillo and Katz, 1954a, b). Dans ces conditions, la relâche de neurotransmetteurs devient minimale et seules quelques vésicules sont libérées à chaque stimulation, permettant un blocage complet de la contraction musculaire tout en préservant la possibilité d'observer l'activité spontanée et les PPMm. Ensuite, une première méthode de calcul implique de diviser l'amplitude moyenne des potentiels de plaque motrice (EPP) par l'amplitude moyenne des potentiels de plaque motrice miniature (mEPP). Une méthode alternative consiste à compter le nombre de manques (absence de relâche à la stimulation) et de le comparer avec le nombre de EPP (Del Castillo and Katz, 1954b). Cette méthode n'est toutefois fiable qu'à partir d'un pourcentage élevé de manques à la stimulation, soit 40 à 50%. Il est également de plus en plus fréquent de mesurer le contenu quantique en utilisant la  $\mu$ -conotoxine-GIIIB, qui permet de bloquer sélectivement les canaux sodiques voltages-dépendants postsynaptiques et de mesurer sans altération le véritable contenu quantique et d'estimer la quantité complète de neurotransmetteurs libérés tout en préservant l'activité spontanée (Reid et al., 1999; Rocha et al., 2013).

### **1.3.1.5 Autorécepteurs et transmission synaptique**

Plusieurs autorécepteurs sont présents sur l'élément présynaptique et permettront d'ajuster et moduler la transmission synaptique, en particulier des récepteurs muscariniques et des récepteurs purinergiques. En effet, les récepteurs purinergiques présynaptiques  $A_1R$

semblent influencer la transmission synaptique à la JNM, diminuant la fréquence de l'activité spontanée du neurone et étant associée à la dépression de l'activité synaptique suite à une stimulation haute-fréquence (Garcia et al., 2013; Todd et al., 2010). Des autorécepteurs muscariniques sont également présents, qui auront également un rôle modulateur sur la transmission synaptique.

### **1.3.2 Fente synaptique**

La fente synaptique est située entre le nerf et la cellule musculaire, et occupe une largeur d'environ 50-100 nm (Wood and Slater, 2001). On y retrouve une simple couche de matrice extracellulaire que l'on appelle la lame basale. De nombreuses protéines spécialisées se retrouvent uniquement dans la partie synaptique de la lame basale, telles que l'acétylcholinestérase (AChE), la laminin  $\beta 2$  et l'agrine. L'AChE est l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine en acétyl + choline dans la fente synaptique, de manière à éviter que son effet ne perdure trop longtemps et ne se propage trop loin spatialement. La laminin  $\beta 2$ , quant à elle, est une molécule sécrétée par le muscle qui s'accumule dans la fente synaptique (Hunter et al., 1989) et possède la capacité de se lier aux canaux calciques voltages-dépendants de type P/Q et N que l'on retrouve à la JNM (Nishimune et al., 2004). En raison du fait qu'ils sont les seuls récepteurs connus à lier spécifiquement les canaux calciques voltage-dépendants synaptiques de la JNM, et que les souris KO pour la laminin  $\beta 2$  démontrent une perte massive des zones actives (Noakes et al., 1995), cette molécule est considérée comme un organisateur de la synapse et des zones actives (Nishimune, 2012).

### **1.3.3 Élément postsynaptique**

L'élément postsynaptique est le troisième élément d'intérêt de notre étude de la JNM et qui fait partie intégrante du processus de transmission synaptique qui mènera finalement à la contraction musculaire. Des milliers de récepteurs s'y entassent et s'accrochent sur la crête des replis de la membrane postsynaptique, prêts à signaler la moindre arrivée d'ACh et à causer

une dépolarisation locale qui mènera éventuellement à l'activation de canaux sodiques voltages-dépendants. C'est donc ici, près de la JNM, qu'aura finalement lieu l'entrée massive de cations qui mènera au couplage excitation-contraction.

### **1.3.3.1 Structure organisationnelle**

L'élément postsynaptique de la JNM se caractérise par une membrane contenant de nombreux renflements et invaginations qui vont permettre de multiplier la surface de contact de manière optimale avec l'acétylcholine, qui est libérée par exocytose lors de l'arrivée d'un potentiel d'action au sein de l'axone. Les longs creux font généralement face aux zones actives chez les mammifères, stratégie qui permet d'emprisonner plus facilement l'ACh et maximise son action sur les récepteurs. On retrouve ainsi au cœur de l'élément postsynaptique des milliers de canaux ioniques séquestrés à haute densité, les récepteurs à l'acétylcholine (nAChs), des récepteurs nicotiniques à 5 unités, tous fidèlement ancrés à la membrane. Cette zone spécialisée sur le muscle, reconnaissable encore une fois en microscopie électronique dû à sa grande densité, représente la densité postsynaptique. Les nAChRs y sont solidement maintenus en place par un vaste système de protéine d'ancrage et de stabilisation que nous survolerons brièvement dans le cadre de cette introduction et dont nous ne mentionnerions que quelques exemples, tels que l'agrine, la kinase spécifique au muscle (MuSK) et LRP4. Ces molécules diverses participent et coordonnent la stabilité de la structure de la densité postsynaptique. Par exemple, MuSK est une tyrosine kinase qui se retrouve en grande concentration dans les densités postsynaptiques et qui joue un rôle essentiel dans l'arrangement et la séquestration des récepteurs dans la densité postsynaptique (DeChiara et al., 1996; Glass et al., 1996; Wu et al., 2010). L'agrine est quant à elle une protéoglycane sécrétée par le MN et les PSCs qui peut induire l'autophosphorylation de MuSK et résulter en une activation subséquente de cette tyrosine kinase (Mittaud et al., 2004). L'interaction entre la molécule Agrin et MuSK s'effectuerait toutefois de manière indirecte, par l'intermédiaire de la protéine LRP4 (protéine 4 relié au récepteur de lipoprotéine de faible densité) (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). De nombreuses autres protéines et voie de signalisation interragissent au cœur de l'élément postsynaptique, mais nous nous limiterons dans la partie

suivante aux informations pertinentes pour la compréhension des phénomènes de transmission synaptique.

### **1.3.3.2 Potentiel de plaque motrice**

Lorsqu'il y a potentiel d'action dans le MNP, l'acétylcholine libéré vient se fixer au nAChRs et induit un changement de conformation qui permet leur ouverture. Une fois ouverts, ces canaux laisseront passer des ions chargés positivement, le  $\text{Na}^{++}$  et le  $\text{Ca}^{++}$ , qui permettront la dépolarisation de la fibre musculaire. Cette dépolarisation locale près de la JNM, qui résulte de la libération de vésicules d'ACh, est appelée potentiel de plaque motrice (PPM), tel que mentionné précédemment. De plus, une certaine activité spontanée est également présente au sein de la terminaison axonale et peut se produire de manière aléatoire, sans qu'aucune stimulation du nerf ne soit nécessaire. Cette dépolarisation attribuable à la relâche de vésicules unitaires porte le nom de potentiel de plaque motrice miniature (PPMm), auquel on fait référence en tant que quantum, tel que mentionné précédemment (Del Castillo and Katz, 1954b). Ces réponses spontanées et évoquées par la stimulation du nerf peuvent être enregistrées dans la fibre musculaire en utilisant l'électrophysiologie et donnent lieu à des variations de potentiel chez les mammifères de moins d'un mV pour les mEPP et de l'ordre de quelques dizaines de mV pour les EPP évoquées par stimulation directe du nerf.

Finalement, cette libération quantique ou dépolarisation induite par l'entrée de sodium et de calcium amènera par la suite l'ouverture de canaux sodiques voltages-dépendants à proximité qui laisseront entrer le sodium et provoqueront un potentiel d'action musculaire menant à la contraction musculaire. La quantité de récepteurs aux canaux sodiques est grandement accrue dans la zone périjonctionnelle située juste au pourtour de la densité postsynaptique, ce qui permettrait apparemment de détecter la dépolarisation de manière encore plus précise et d'augmenter les chances de succès de la contraction.

### **1.3.4 Élément glial : les cellules de Schwann périssynaptiques**

#### **1.3.4.1 Caractérisation**

La dernière composante de la JNM qu'il importe d'aborder est l'élément glial qu'elle contient, soit les cellules de Schwann périssynaptiques. Au nombre de 3 à 5 environ chez une JNM mammifère adulte (Love and Thompson, 1998; Todd and Robitaille, 2006), ce sont des cellules de Schwann qu'on appelle également terminales, puisqu'elles sont présentes au bout de l'axone et ne sont pas myélinisantes, malgré le fait qu'elles possèdent plusieurs marqueurs gliaux myélinisant tels que la protéine 0 ( $P_0$ ) et la glycoprotéine associée à la myéline (Georgiou and Charlton, 1999). Ces cellules gliales, recouvertes elle aussi de lame basale (Saito and Zacks, 1969) composée d'une matrice extracellulaire distincte (Ko et Robitaille, 2014) s'assoient littéralement sur la JNM et exercent des fonctions semblables à celles des astrocytes dans le système nerveux central (Auld and Robitaille, 2003). Elles comportent de nombreux doigts ou prolongements pour couvrir la partie pré et postsynaptique, en plus d'exprimer des récepteurs particuliers qui leur permettent de décoder la transmission synaptique près des zones actives, notamment des récepteurs muscariniques ainsi que des récepteurs purinergiques P2X et P2Y (Darabid et al., 2013; Robitaille, 1995; Rochon et al., 2001; Todd et al., 2007; Todd et al., 2010; Todd and Robitaille, 2006). Elles ne sont pas électriquement excitables, mais l'activation de ces récepteurs couplés aux protéines G induit par l'activité synaptique et la libération de neurotransmetteurs provoque une élévation de calcium provenant de leurs réserves internes (Castonguay and Robitaille, 2001; Jahromi et al., 1992; Reist and Smith, 1992). Les PSCs peuvent également libérer des gliotransmetteurs divers suivant l'activité synaptique leur permettant de moduler en retour la transmission synaptique (Todd et al., 2010).

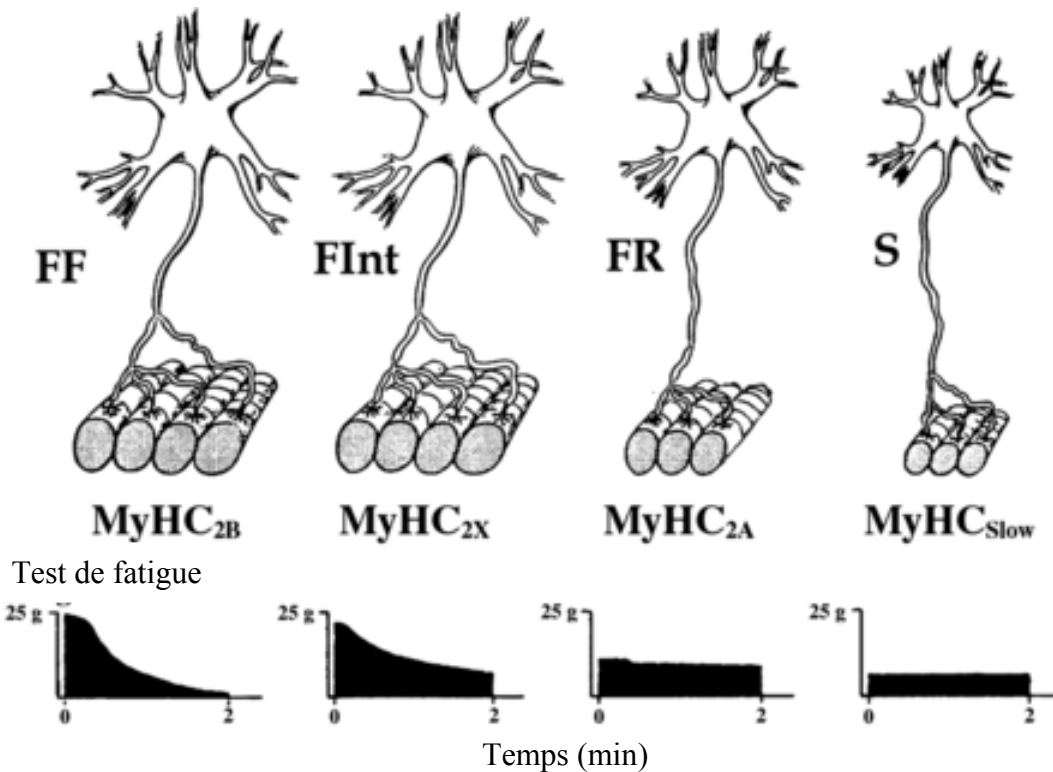
#### **1.3.4.2 Fonctions des cellules gliales à la JNM**

Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions importantes pour la JNM, notamment l'établissement et la stabilisation de la synapse, en plus de participer au processus de réinnervation (Son et al., 1996). Leur action sur le cytosquelette et la stabilisation de la

synapse s'exercerait via l'activation de leurs mAChRs, qui prévient la régulation du GFAP et contribue à la stabilisation de la synapse en présence de transmission synaptique (Georgiou et al., 1999; Georgiou et al., 1994). Leurs fonctions synaptiques sont extrêmement diverses et présentes très tôt dans le développement : elles participent en effet par exemple au processus d'élimination des synapses surnuméraires durant le développement qui mène à la monoinnervation de la JNM adulte (Darabid et al., 2013). Elles peuvent également moduler les phénomènes de plasticité synaptique à la JNM en augmentant ou en diminuant la libération de neurotransmetteurs (Castonguay and Robitaille, 2001; Todd et al., 2010) et en libérant des molécules exerçant des actions diverses (Robitaille, 1998; Todd et al., 2010). Des propriétés intrinsèques aux PSCs semblent être en jeu puisque des variations observées sur des JNM de différents types de muscles ne peuvent s'expliquer simplement par la quantité de neurotransmetteurs relâchés (Rousse et al., 2010).

### **1.3.5 Les unités motrices**

Une unité motrice (UM) est un ensemble comprenant un MN ainsi que toutes les fibres musculaires que celui-ci innervent, puisqu'un même neurone moteur innerve généralement plusieurs fibres musculaires. Il en existe 3 types principaux : les unités motrices rapides-fatigables (FF), les unités motrices rapide-résistantes (FR), et les unités motrices lentes (L). Les unités rapide-intermédiaire (Fint) sont parfois également considérées comme un type spécifique. Chaque UM est composée d'un motoneurone possédant des propriétés spécifiques qui vont aller de pair avec un certain type de fibres musculaires, et fourniront donc ses propriétés caractéristiques à l'unité motrice (voir figure 1.4). Recrutées dans un ordre particulier en fonction de l'intensité de la tâche et de la force demandée pour générer un mouvement (les plus lentes d'abord, ensuite les rapides), chaque type de UM présente des particularités structurales et fonctionnelles qui lui sont propres, que nous examinerons dans la présente section.



**Figure 1.4** Comparaison des propriétés des types d'unités motrices lentes, rapide résistante à la fatigue et rapide-fatigable en fonction de la taille, du type de chaînes de myosine et de la résistance à la fatigue. Représentation schématique des 4 types d'unités motrices, soit les rapides-fatigables (FF), les rapides intermédiaires (FInt), les rapides résistantes à la fatigue (FR) et les lentes (S). Noter que la taille des MN et de l'unité motrice (donc du nombre de fibres innervées) est plus grande chez les UM FF et FInt et diminue progressivement chez les UM FR et S. Graphiques montrant la force de contraction en fonction du temps chez les 4 types d'unités motrices. La force générée est la plus grandes chez les unités motrices rapides FF et FInt, qui toutefois se fatiguent beaucoup plus rapidement que les fibres FR ou S. Noter le gradient progressif des propriétés des différentes UM. MyHC, chaîne de myosine. Tiré de (Mantilla and Sieck, 2013). Droit de reproduction à des fins non commerciales inclus dans la license Creative Commons Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported License.



### **1.3.5.1 Classement des unités motrices**

Le classement des unités motrices réfère en général aux propriétés contractiles des fibres musculaires qui les composent. Ces variables comprennent la force de contraction, la vitesse de contraction et la capacité de résister à la fatigue et de soutenir une stimulation sur une longue période. Cependant, le patron d'activité du motoneurone apparaît déterminant dans la composition en MHC des fibres musculaires, des expériences d'innervation croisée chez le chat et le rat ayant permis de mettre en lumière l'influence du patron de décharge sur les propriétés contractiles et la composition des fibres musculaires (Lomo et al., 1974). Les fibres musculaires des diverses unités motrices peuvent être distinguées de deux manières principalement. Tout d'abord, en fonction du métabolisme de l'ATPase myofibrillaire (Gorza, 1990; Sieck et al., 1995). Cette technique est relativement corrélée avec une deuxième méthode : la caractérisation immunohistochimique du contenu en chaînes de myosine dont il existe quatre types chez les mammifères, soit MHCI, IIa, IIx et IIb. Les unités motrices F comprennent les fibres musculaires de type II alors que les unités motrices S comprennent des fibres musculaires de type I. Les fibres IIa se retrouvent dans les unités motrices FR, les fibres IIx dans les Fint et les fibres IIb dans les plus rapides, les FF.

### **1.3.5.2 Différences morphologiques entre les types d'unités motrices**

Il existe un grand nombre de différences structurales dénotées entre les catégories de UM. Chez le rat par exemple, le diamètre de l'axone de l'unité motrice varie aussi en fonction du type de chaînes de myosine, les axones aux plus petits diamètres innervant les fibres lentes et le diamètre augmentant de manière progressive chez les fibres de type IIa, IIx et IIb (Prakash et al., 1996). Les composantes pré et postsynaptiques de la JNM possèdent également une structure plus complexe et élaborée suivant le même continuum : par exemple, des travaux extensifs sur le diaphragme de rat a montré que les fibres FF présentant les plus nombreux branchements axonaux, qui sont toutefois plus courts, alors que les fibres S présentent un profil inverse (Sieck and Prakash, 1997). L'aire de la plaque motrice est aussi réduite chez les fibres S et s'agrandit également de plus en plus chez les fibres IIa, IIx et IIb (Sieck and Prakash, 1997). De plus, la taille de la JNM est normalement corrélée avec le diamètre de la

fibre musculaire (Balice-Gordon et al., 1990; Balice-Gordon and Lichtman, 1990; Prakash et al., 1996; Prakash et al., 1995), celui des fibres rapides étant par exemple près de 3 fois plus large que chez les fibres lentes chez l'adulte. Aucune différence de diamètre n'est cependant perceptible avant l'expression des diverses MHC à 21 jours chez le rat (Sieck and Prakash, 1997). En ce qui a trait à l'innervation, le pourcentage de colocalisation de l'élément présynaptique versus l'élément postsynaptique est presque maximale chez les fibres lentes pour diminuer progressivement et devenir autour de 70% chez les fibres rapides du diaphragme du rat (Sieck and Prakash, 1997).

### **1.3.5.3 Propriétés synaptiques et contractiles des unités motrices**

De manière générale, les différents types d'unités motrices diffèrent selon des variables évidentes tels que la force et la rapidité de contraction, qui semblent étroitement liées aux types de MHC contenus dans les fibres musculaires. Ainsi, toutes les fibres musculaires d'une même unité motrice ont une composition similaire en MHC. Par exemple, on retrouve majoritairement les unités motrices lentes dans des muscles impliqués dans des mouvements répétitifs et posturaux, comme par exemple dans le Soleus, un muscle postérieur de la jambe impliqué dans le maintien de la posture qui comprend principalement des fibres de type S et FR chez la souris (Augusto et al., 2004). Les UM S doivent par conséquent posséder l'équipement et la machinerie métabolique pour suffire à la tâche et décharger sur de longues périodes sans montrer de fatigue. Ainsi, les unités motrices S sont généralement très résistantes à la fatigue, en plus d'avoir un contenu enrichi en mitochondrie et une vitesse de contraction moindre (Purves et al., 2001). Les MN associés, de type S, présentent ainsi un patron de décharges toniques à basse fréquence (10-30 Hz) chez la souris (Ritter et al., 2014) ainsi que chez le rat (Hennig and Lomo, 1985). Elles présentent toutefois une vitesse et une force de contraction moindre que les fibres FR et FF (Purves et al., 2001).

Les unités motrices rapides montrent un tout autre cas de figure : elles contractent plus rapidement, permettant une plus grande génération de force. Les UM FR produisent environ en moyenne le double de la force que les UM S, alors que les UM FF produisent également le double de la force des UM FR (Purves et al., 2001). Les UM FR ont un patron de décharge à

des fréquences moyenne de 40-50 Hz chez la souris (Ritter et al., 2014) et le rat (Hennig and Lomo, 1985). Bien que les décharges des MN FF soient plus rares (environ 1% du temps), leur fréquence de décharge est toutefois beaucoup plus élevée, avec un doublet ou un triplet à très haute fréquence (200-300 Hz) au tout début de la décharge pour une durée très courte (millisecondes) qui se stabilisent ensuite autour de 80 Hz en moyenne chez le rat (Hennig and Lomo, 1985). Ces quelques stimuli à d'extrêmes hautes fréquences semblent déterminants pour accroître la force générée par les unités motrices rapides (Hennig and Lomo, 1987; Mrowczynski et al., 2015). Cependant, la fatigabilité des unités motrices rapides FF et Fint amène une plus grande probabilité d'observer un manque suite à une stimulation répétée, comparativement à celles de types S et FR (Clamann and Robinson, 1985; Sieck and Fournier, 1990). La propension à la fatigue plus grande manifestée par les unités motrices F semble explicable par une quantité de vésicules expressément disponibles pour la relâche diminuée (Reid et al., 1999).

## **1.4. La jonction neuromusculaire dans la SLA**

La JNM, essentielle à la réalisation de toute forme de contraction musculaire volontaire, semble subir des altérations cruciales durant le développement de la pathologie qui caractérise la SLA. En effet, de multiples altérations morphologiques, fonctionnelles et synaptiques vont toucher les trois composantes de la JNM tout le long de la progression de la maladie, bien avant l'apparition des premiers symptômes (Arbour et al., 2015; Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000).

### **1.4.1 Altérations morphologiques de la JNM**

#### **1.4.1.1 Dénervation et détachement des protéines**

De nombreuses altérations au niveau de la morphologie de la JNM ont été mis en lumière avant l'apparition des premiers symptômes cliniques dans la SLA chez des modèles murins de la maladie et également d'autres modèles invertébrés (voir Fig. 1.5 pour un

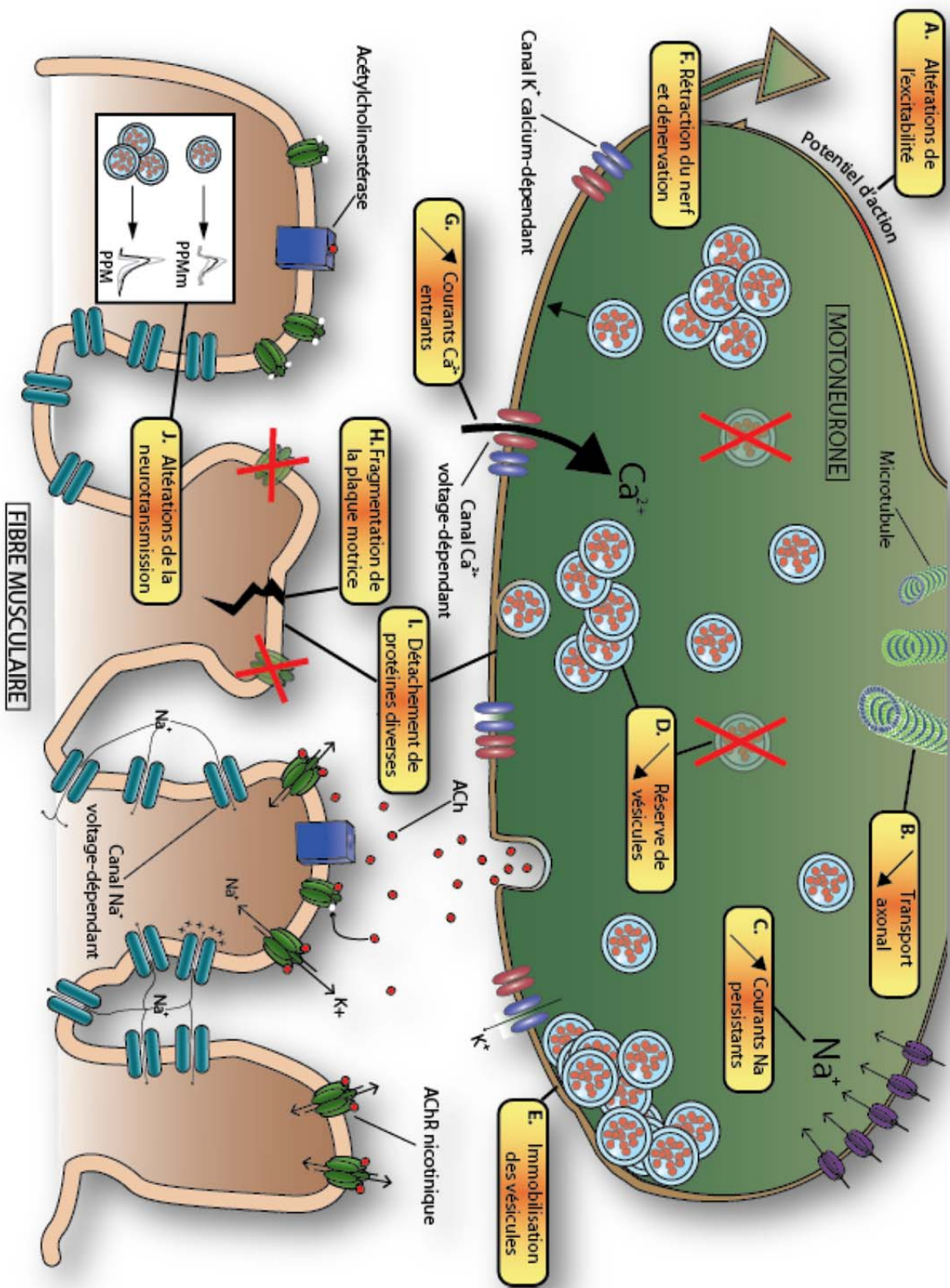
résumé). Par exemple, la perte d'innervation complète ou partielle représente un indice plus qu'évident du mauvais état de fonctionnement d'une JNM, puisque la fibre musculaire est ainsi privée de communication synaptique et ne peut donc plus contracter efficacement de manière volontaire. Une certaine dénervation est ainsi mise en lumière très rapidement durant la maladie dans des modèles animaux portant la mutation SOD1<sup>G93A</sup>, en représentant ainsi l'un des signes cliniques les plus précoces, bien avant l'apparition des premiers symptômes et la dégénérescence des corps cellulaires des neurones moteurs dans la moelle épinière (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000). Des degrés divers d'atrophie musculaire et le détachement de protéines présynaptiques de la JNM caractérisent ainsi la période présymptomatique chez la souris SOD1<sup>G93A</sup>, événements qui précèdent de plusieurs semaines la mort des corps cellulaires des MN (Narai et al., 2009). De plus, une élégante étude a démontré que la préservation des corps cellulaires des neurones moteurs suite à la délétion du gène Bax, impliqué dans la mort cellulaire programmée, n'empêche pas la destruction de la JNM et n'a eu que peu d'effets sur les symptômes et la survie de ce même modèle transgénique (Gould et al., 2006). Des altérations de la morphologie du nerf et des JNM sont également présentes chez des modèles invertébrés de la SLA, notamment le poisson zébré SOD1G93A (Sakowski et al., 2012), TDP-43 (Armstrong and Drapeau, 2013a) ou encore FUS (Armstrong and Drapeau, 2013b) et le ver *c. elegans* TDP-43 (Vaccaro et al., 2012). Des anomalies du transport axonal ont également été mises en lumière (De Vos et al., 2007), spécialement celui de l'acétylcholine transférase (Tateno et al., 2009). Toutes ces observations des anomalies observables en périphérie ont mené à l'idée que la SLA pouvait être une axonopathie distale (Dupuis and Loeffler, 2009; Fischer et al., 2004; Moloney et al., 2014), dont les dommages débuteraient au niveau périphérique à la JNM et se propageraient ensuite au soma du neurone.

#### **1.4.1.2 Vulnérabilité différentielle des unités motrices à la dénervation**

Pour continuer dans la même veine, le patron caractéristique de dénervation observable semble refléter une vulnérabilité spécifique des unités motrices rapides (FF), les JNM des unités FF dénervant les premières dans le modèle rapide de SOD1<sup>G93A</sup>, suivies par les unités motrices FR et finalement les lentes qui sont plutôt résistantes jusqu'à la fin (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006). De plus, cette vulnérabilité précoce des unités motrices FF résulte en une

dénervation plus précoces des muscles à contraction rapide tels que le gastrocnémien et le tibialis antérieur par rapport à des muscles à contraction lente tels que le Soleus par exemple durant la maladie (Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008). Un patron de vulnérabilité spécifique semble donc bel et bien caractériser la maladie.

Chez la souris SOD1<sup>G93A</sup>, une certaine innervation compensatoire par de minces axones se produit toutefois (Schaefer et al., 2005), mais seulement au profit des unités motrices FR. La réinnervation semble être effectuée par les unités motrices S, qui résistent à la maladie le plus longtemps et présentent la plus grande plasticité synaptique morphologique (Pun et al., 2006). Cependant, la réinnervation des unités motrices FF n'est pratiquement pas observée dans le même modèle animal (Pun et al., 2006), ce qui les rend donc extrêmement vulnérable et entraîne leur perte précoce. Cette incapacité à la réinnervation pourrait semble-t-il être explicable par le fait que les PSCs des unités motrices FF dans ce modèle expriment spécifiquement des sémaphorines 3A lors de la dénervation, ce qui constituerait un stimulus répulsif pour l'axone (De Winter et al., 2006). Dans la même veine, il existe des bénéfices apparents de l'interruption de la liaison des sémaphorines 3a avec leurs récepteurs Neuropilin-1 via l'injection quotidienne d'anticorps anti-NRP1 chez la souris SOD1<sup>G93A</sup>, ce qui laisse croire que cette voie de signalisation joue probablement un rôle dans la dégénérescence de la JNM et de l'axone (Venkova et al., 2014). En effet, une diminution de la dénervation ainsi qu'un renversement du phénotype de faiblesse motrice, corrélé avec une plus grande préservation de la JNM, a été observée suite à cette intervention (Venkova et al., 2014).



**Figure 1.5** *Altérations synaptiques dans la SLA.* Représentation schématisée des mécanismes pathologiques observés à la jonction neuromusculaire dans la SLA et pouvant affecter la transmission synaptique. **A**, Altérations de l'excitabilité du motoneurone. **B**, Diminution du transport axonal. **C**, Augmentation des courants sodiques persistants. **D**, Diminution de la taille de la réserve de vésicules synaptique. **E**, Accumulation et stagnation de vésicules à la membrane présynaptique. **F**, Rétraction du nerf et dénervation, signe précoce de la maladie qui touche préférentiellement les UM rapides. **G**, Augmentation des courants calciques entrants dans les canaux de type P et Q, causée par des anticorps présents dans le sérum des patients sporadiques. **H**, Fragmentation de la plaque motrice. **I**, Détachement de protéines diverses de la jonction neuromusculaire. **J**, Des altérations contradictoires de la neurotransmission ont déjà été répertoriées.

## 1.4.2 Altérations synaptiques

### 1.4.2.1 Altérations de l'excitabilité des motoneurones

Des altérations diverses des propriétés d'excitabilité des motoneurones *in vivo* et *in vitro* semble caractériser la SLA. En période embryonnaire, des expériences réalisées en utilisant des souches mutantes de neurones en culture ont ainsi démontré que de nombreuses caractéristiques de ces neurones les rendent hyperexcitables : les potentiels d'action des neurones moteurs corticaux ont une durée réduite (Pieri et al., 2003), les MN spinaux tendent à décharger à une fréquence plus élevée pour un même stimulus résultant en une courbe de la fréquence en fonction du courant altérée (Kuo et al., 2004; Pambo-Pambo et al., 2009), en plus d'avoir une fréquence augmentée de la transmission excitatrice et inhibitrice (van Zundert et al., 2008). De plus, ils présentent une résistance réduite aux stimuli entrants à 8 ou 9 jours post-natal, parallèlement à une complexification de l'arbre dendritique (Amendola et al., 2007). Ces changements de l'excitabilité pourrait en partie être expliqués par la présence d'un courant sodique persistant qui augmenterait l'excitabilité des neurones moteurs (Pambo-Pambo et al., 2009; Pieri et al., 2009), particulièrement ceux ayant une haute valeur de

conductance (Kuo et al., 2005), qui sont habituellement les plus larges. Les propriétés passives de la membrane tels que le potentiel membranaire ne semblent toutefois pas affectés (Kuo et al., 2005; Pieri et al., 2003). Cependant, les propriétés décrites ci-dessus changent également avec le développement.

Afin d'être en mesure d'avoir une vision plus juste et globale en ce qui a trait à l'excitation des MN, il est intéressant de dresser le portrait de la situation à différentes périodes de la maladie et également sur des modèles *in vivo* pour déceler si ces changements sont durables et persistants. De récentes évidences pointent ainsi en direction d'une hypoexcitabilité chez certains MN observée *in vivo* dans un modèle murin de SLA (Delestree et al., 2014). En effet, la présence d'une augmentation de la conductance de l'input qui normalement réduirait l'excitabilité du MN est contrebalancée chez la majorité des MN par un courant dépolarisant apparaissant juste avant le seuil du potentiel d'action, qui permet donc de maintenir une certaine homéostasie de l'excitabilité du MN. Cependant, chez une proportion importante de MN cet équilibre n'est pas conservé et ceux-ci se révèlent donc hypoexcitables *in vivo*, étant dans l'incapacité de maintenir une fréquence de décharge en réponse à des suites de courants dépolarisants (Delestree et al., 2014). D'autres résultats abondent dans le même sens chez la souris SOD1<sup>G127X</sup> présymptomatique, montrant que les neurones spinaux adulte du modèle ne sont pas hyperexcitables *in vivo* à leur potentiel de repos et que leurs propriétés intrinsèques ne sont pas différentes de leurs congénères WT (Meehan et al., 2010). Toutefois, à des potentiels plus dépolarisés, ceux-ci ont rapporté des courants entrants persistants apparaissant à des fréquences de décharge moindre (Meehan et al., 2010).

#### **1.4.2.2 Altérations de la transmission synaptique à la JNM**

Des anomalies synaptiques ont depuis longtemps été répertoriées chez les personnes ayant un diagnostic de SLA, de même que chez presque tous les modèles animaux portant une mutation génétique causant la SLA. De nombreuses modifications touchant la transmission synaptique à la JNM parfois contradictoires ont ainsi été démontrées dans les dernières années, et ce en utilisant des modèles animaux vertébrés et invertébrés ainsi que des mutations génétiques variées. Toutefois, aucune étude n'a tenté de corréler les changements rapportés



avec le type d'unités motrices, malgré le fait que les UM semblent présenter une susceptibilité différentielle dans la pathologie.

Tout d'abord, la SLA étant une maladie amenant des déficits moteurs, il apparaît intuitif de croire que cette pathologie résultera en une certaine réduction de la neurotransmission. En accord avec cette affirmation, les premières études électrophysiologiques de fibres unitaires ont montré que les JNM des patients souffrant de SLA avaient un contenu quantique diminué par rapport aux sujets contrôle, qui serait en fait dû à une diminution des stores de vésicules synaptiques disponibles (Maselli et al., 1993). Contrairement à cette découverte, le sérum des patients ALS contiendrait des anticorps qui interagiraient avec les canaux calciques de la JNM. Ceux-ci causeraient une augmentation de la transmission synaptique dans des préparations neuromusculaires de souris WT en augmentant le calcium intracellulaire, en induisant des dommages cellulaires et la mort neuronale *in vitro* (Appel et al., 1995; Engelhardt et al., 1995). Ces anticorps présents dans le sérum d'environ 75% des patients sporadiques mais non familiaux, se lient aux canaux calciques dépendant du potentiel de type P et Q, ce qui résulte par conséquent en une augmentation dommageable des courants calciques entrants (Appel et al., 1995).

Ensuite, chez la souris SOD1<sup>G93A</sup> cette fois, des travaux récents ont démontré par le biais d'enregistrements électrophysiologiques dans le muscle du diaphragme, qu'un groupe de JNM avait un contenu quantique augmenté en période présymptomatique (Rocha et al., 2013). Toutefois, en accord cette fois avec les résultats obtenus précédemment par Maselli et ses collaborateurs chez l'humain, une proportion de JNM présentaient en période symptomatique un contenu quantique diminué alors que le reste était redevenu plutôt normal (Rocha et al., 2013). De plus, une seconde étude s'intéressant aux différences de genre dans la transmission synaptique du diaphragme du même modèle animal a montré une activité spontanée diminuée en période présymptomatique. L'activité évoquée et le contenu quantique demeuraient toutefois inchangés (Naumenko et al., 2011). Une réserve de vésicules synaptiques diminuée était également observable, cependant chez les souris mâles seulement (Naumenko et al., 2011). Il est très surprenant de constater qu'aucune corrélation n'a malheureusement été effectuée en fonction du type de fibres dans l'ensemble de ces travaux. Cette variable

d'importance est malheureusement demeurée ignorée, laissant ouverte la question de possibles effets synaptiques spécifiques au type d'unités motrices dans la SLA.

Des défaillances synaptiques ont aussi été reportées chez le poisson zébré modifié génétiquement exprimant la mutation TDP-43. Les motoneurones de type rapide présentent une amplitude de courants excitateurs réduite et une fréquence spontanée de courants excitateurs miniatures diminuée par rapport à leurs congénères WT, de même qu'une fidélité synaptique moindre suite à l'injection de courant (Armstrong and Drapeau, 2013a). Des modèles génétiques de poissons zébrés atteints de la mutation FUS ont également montré qu'une perte ou un gain de fonction de l'enzyme FUS étaient responsables de changements synaptiques observables du même type (Armstrong and Drapeau, 2013b). Même un modèle de *drosophile* associé à la mutation FUS présentent des déficits de transmission synaptique à la JNM, amenant un contenu quantique réduit et une diminution significative de l'amplitude des réponses miniatures (Machamer et al., 2014).

## Objectifs

À la lumière des éléments présentés dans l'introduction, il nous est apparu nécessaire de réaliser une étude extensive de la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire dans le contexte de la SLA, afin de mieux caractériser et comprendre les phénomènes pathologiques affectant la JNM et son fonctionnement physiologique. Compte tenu de la vulnérabilité différentielle des unités motrices dans la SLA et des données contradictoires précédemment publiée, l'hypothèse principale du présent travail était que l'activité synaptique serait altérée différemment en fonction du type d'unités motrices dans la SLA. De plus, comme la maladie est caractérisée par diverses phases cliniques et une longue période présymptomatique, nous avons émis l'hypothèse que les perturbations synaptiques pourraient être transitoires et évoluer suivant la progression de la maladie. Donc, les objectifs principaux de la présente étude consistait à caractériser l'effet de la mutation SOD1<sup>G37R</sup> sur la transmission synaptique en prenant en considération les différents types d'unités motrices et le déroulement temporel de la maladie. Le modèle de souris SOD1<sup>G37R</sup> a été privilégié en raison du développement lent et progressif de la maladie, puisqu'il s'agit d'un modèle particulièrement intéressant pour étudier diverses périodes bien définies et décortiquer adéquatement l'évolution temporelle de la SLA. Les expériences du présent projet ont été réalisées en effectuant principalement des enregistrements électrophysiologiques et de l'immunohistochimie dans le muscle à contraction lente *Soleus* (SOL) et le muscle à contraction rapide *Extensor Digitorum Longus* (EDL). De plus, nous voulions étudier l'évolution de la morphologie de la JNM dans les 2 préparations musculaires étudiées de manière à pouvoir vérifier l'intégrité de la JNM aux âges étudiés, afin de suivre l'ordre d'apparition des changements mais également de vérifier si des altérations qui pourraient exercer une influence sur la transmission synaptique sont présentes.

## **Chapitre 2 : Article**

# **Opposite synaptic alterations at the neuromuscular junction in an ALS mouse model: when motor unit matters**

Tremblay Elsa<sup>1-2</sup>, Martineau Éric<sup>1-2</sup> et Robitaille Richard<sup>1-2\*</sup>

1 : Département de Neurosciences, Université de Montréal

2 : Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal

\* To whom correspondence should be addressed:

Richard Robitaille

Département de Neurosciences,

2960 Chemin de la Tour, Pavillon Paul-G.-Desmarais

Montréal (Qc) H3C 3J7

## 2.1 Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis is a late-onset neurodegenerative disease that leads to progressive paralysis and death within 2 to 5 years. One of the first events in the pathologic process is the denervation of the neuromuscular junction (NMJ). NMJs show temporal patterns of vulnerability in ALS depending on the motor units types (MU): NMJs from fast-fatigable (FF) MU are the first to denervate, followed by the fast-fatigue resistant (FR) and finally the slow (S) MU. However, no longitudinal study has taken into account all MU when investigating synaptic activity at the NMJ in ALS. We therefore hypothesized that NMJ function would be altered in a MU type specific manner in ALS. Using electrophysiology and immunohistochemistry, neurotransmission and morphological changes have been explored in two nerve-muscle preparations of the SOD1<sup>G37R</sup> mouse and their wild-type (WT) littermates: the slow-twitch *Soleus* (SOL), which contains S MU and FR MU and the fast-twitch *extensor digitorum longus* (EDL), which contains mostly FF MU. The characterization of WT spontaneous and evoked activity first allowed us to develop a Motor Unit Synaptic Profile (MUSP), a useful reference to facilitate analysis and comparison of motor neuron disease neurotransmission. At an asymptomatic stage (P160), synaptic strength was already altered according to the MU type: the FF NMJs of the EDL and the S NMJs of the SOL had respectively a lower and a higher quantal content compared to WT, while it was unchanged in FR NMJs. At a presymptomatic age (P380), differences in quantal content were persistent in FF MU, while denervation and nerve sprouting were frequent in the mutant EDL. However, at clinical disease onset (P425), evoked activity was changed in the SOL: FR MU now presented a reduced quantal content compared to WT MU, whereas the S MU presented an activity similar to WT MU. This study demonstrates how SOD1 mutation has a dual effect on neurotransmission at the NMJ, affecting differently the different MU. Taken together, these results highlight specific synaptic changes occurring in a definite temporal sequence in the SOD1<sup>G37R</sup> mouse that appear to evolve with disease progression and seem to be predictive of vulnerability to neurodegeneration.

## 2.2 Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal late-onset neurodegenerative disease and is the most frequent motor neuron disorder in North America. Upper and lower motor neurons are lost progressively in the disease process, leading to motor deficits, weakness, speech impairment and paralysis. Several genes have been implicated in the etiology of ALS, as 10% of the cases appear to carry a genetic mutation causing a familial form of ALS, the remaining being sporadic (Renton et al., 2014). Of the various identified gene candidates, SOD1 has been the first discovered in 1993 (Rosen et al., 1993) allowing the generation of several animal models developing a motor phenotype and a pathophysiology similar to the human one (Bruijn et al., 1997; Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995). A toxic gain of function of the enzyme seems to trigger the apparition of the symptoms.

Various morphological and physiological alterations of the neuromuscular junction (NMJ) have been previously reported in several SOD1 models, leading to the dying-back hypothesis (Fischer et al., 2004; Moloney et al., 2014; Narai et al., 2009), a view of the disease in which the damage initiate from the distal nerve and progressively impairs the MN soma and eventually lead to motor neuron death. Indeed, denervation and loss of proteins like SV2 has been one of the earliest highlighted abnormalities in the well-characterized mouse model SOD1<sup>G93A</sup>, occurring prior to symptoms onset, before the loss of ventral root axons in the spinal cord (Fischer et al., 2004; Narai et al., 2009). This loss affects primarily FF fibers, as they are the first to denervate and show the greatest vulnerability, followed by FR and S fibers, which are the most resistant and persist until end stage (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006). An early stalling of synaptic vesicles in the nerve terminal has also been observed, preferentially in fast-twitch fibers (Pun et al., 2006). A specific pattern of denervation seems therefore to be observed in ALS. However, this loss of large MU first in fast-twitch muscle will be only partially replaced by small MU (Hegedus et al., 2008), as a compensatory reinnervation by slow axons seems to occur (Schaefer et al., 2005).

Synaptic alterations also characterize the development of this motor neuron disease. Hence, a diminished probability of neurotransmission in the presymptomatic SOD1<sup>G93A</sup> mice has been reported in fibers at the NMJs of the diaphragm muscle (Souayah et al., 2012). On

the contrary, Rocha et al. (2013) recently published a study using the same nerve-muscle preparations that showed a distinct group of mutant NMJs with a higher quantal content at a presymptomatic stage. After symptoms onset however, SOD1 NMJs presented no longer any augmentation in the quantal content. Moreover, a group of NMJs showed a decreased quantal content at that stage. In addition, (Armstrong and Drapeau, 2013a) reported in spinal motoneurons of the mutant TDP-43 *zebrafish larvae* a diminished synaptic fidelity as well as decrease of spontaneous activity. Furthermore, either a gain or a loss of FUS function impairs neurotransmission in a *drosophila* model by reducing quantal content and current amplitude (Machamer et al., 2014). Similar findings have also been reported in the *zebrafish* harboring a FUS mutation (Armstrong and Drapeau, 2013b). However, it is unclear how these previous discrepancies can be explained to some extent by the MU type, given that none of these studies have taken this factor into account to further understand the selective synaptic effects of ALS on the various MU.

We therefore postulate that synaptic activity is altered differentially depending on the MU type and will evolve during the disease process, which would be consistent with the selective vulnerability of specific groups of MU and the temporal pattern of denervation observed in ALS. Using the SOD1<sup>G37R</sup> mice, a slow and progressive model of ALS, we specifically recorded neurotransmission from three different MU types of two different muscles: the fast-twitch *Extensor digitorum longus* (EDL) and the slow-twitch *Soleus* (SOL). Our results demonstrate the presence of opposite synaptic changes primarily in FF and S MU: the FF MU present a persistent reduced synaptic strength, whereas the S fibers first present an increase in the synaptic strength that disappears near the onset of the disease. FR MU also become significantly weaker after disease onset. This work highlights the importance to consider MU types in further studies given their relative differential vulnerability to the disease.

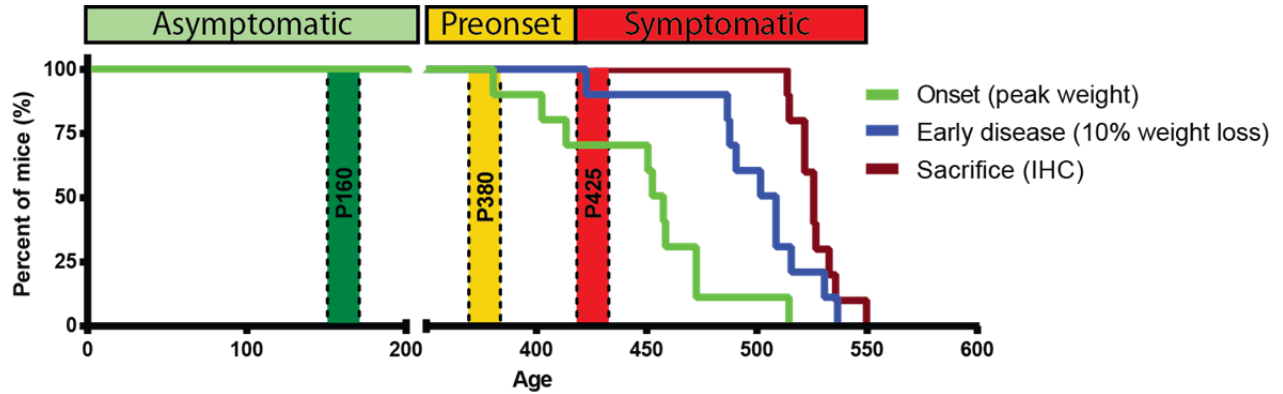
## 2.3 Material and methods

### *Animals*

Mice overexpressing the human mutated SOD1<sup>G37R</sup> transgene were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and were bred at our animal facilities on a C57BL/6 background. These mice, referred to as line 29, are known to express 2 to 5 fold the level of mutant proteins in the brain, spinal cord and brainstem and develop a slow motor neuron syndrome that resembles the human pathology characterised by a progressive weakness and a late onset of hindlimb paralysis originally occurring around 12-13 months of age (Wong, 1995). However, this mouse strain currently exhibits an extended lifetime up to more than 500 days of age, confirmed by Jackson Laboratory (see Fig. 2.1 for the time course of the disease of the SOD1<sup>G37R</sup> mouse in our facilities). Three specific time periods were investigated in the present experiment in the SOD1<sup>G37R</sup> and their WT littermates: the asymptomatic stage, P150-170 (P160), the presymptomatic stage, P370-390 (P380) and the symptomatic stage, P420-460 (P425). Unfortunately, not long after disease onset as defined by the start of weight loss, nerve-muscle preparations of SOL were very fragile, the muscle fibers were easily broken and spontaneous contractions would inevitably occur. These contractions were calcium-dependant and were usually blocked by the modified Ringer's solution with a low calcium concentration. However membrane potential ( $E_m$ ) of those fibers was not consistent, vacuoles were easily formed in the muscle fibers and the general state of the muscle limited the possibility of performing electrophysiological recordings. Consequently, mice used in the actual experiment in the symptomatic phase were at the start of the weight loss.

PCR amplification of the human SOD1 transgene was performed by taking a small sample of tail at the time of the weaning in order to genotype the mice. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and the Université de Montréal.





**Figure 2.1** Time course of disease progression in the *SOD1<sup>G37R</sup>* mice model. Graphic showing percentage of mice reaching disease onset (pale green line), early disease (blue line) and age at time of sacrifice, after more than 25% weight loss, hindlimb and forelimb paralysis (red line). Based on symptoms and clinical nomenclature, the asymptomatic period was definite from birth until P350 (dark green), the presymptomatic (preonset) stage from P350 until P425 approximately (yellow) and the symptomatic stage started at around P425 until the endstage, which is normally P550-600. In this experiment, we investigated three specific time periods corresponding to the three stages represented in the figure : P160, P380 and P425. WT, N = 10; SOD1, N = 9.

### Nerve-muscle preparations

Nerve-muscle preparations of the *Soleus* and *Extensor Digitorum Longus* were carefully dissected in a Ringer's Rees solution (in mM) : 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 11 Glucose, 0.3 Glutamic Acid, 0.4 Glutamine, 5 BES, 0.036 Choline Chloride and  $4.34 \times 10^{-7}$  Cocarboxylase. After dissection, the intact muscle preparations were pinned in a Sylgard-coated recording chamber constantly perfused with a Ringer's Rees oxygenated solution (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). The pH of the solutions was kept around 7.2-7.4 and temperature was held constant between  $28 \pm 2$  °C.

### *Electrophysiological recordings of synaptic transmission*

Suprathreshold stimulation (2-5X) of the tibial nerve (SOL) or the deep peroneal nerve (EDL) was performed using a suction electrode filled with Ringer's Rees solution. Muscle contractions were prevented using a modified Ringer's Rees solution with a low  $\text{Ca}^{++}$  (1mM) and a high  $\text{Mg}^{++}$  concentration (6.4mM). Recordings were considered successful when  $E_m$  of a muscle fiber was between - 65mV to - 80mV, which represents an indicator of the muscle quality. In addition, a recording was considered valid and included in further analysis if  $E_m$  variation was less than 5 mV during the experiment.

Intracellular recordings of spontaneous and nerve-evoked synaptic responses with a sharp glass microelectrode (WCI, 1.0mm) filled with 3mM KCl (35-70 M $\Omega$ ) were performed as previously described elsewhere (Arbour et al., 2015; Darabid et al., 2013). Briefly, spontaneous activity was first recorded for a period of five to ten minutes without any stimulation of the nerve, allowing the measure of miniature endplate potential (mEPP) frequency and amplitude. The frequency of miniature events was obtained by dividing the number of mEPP identified by the time in seconds for a period of at least five minutes (min 100 mEPP). Then, quantal content and paired-pulsed facilitation (PPF) were calculated as a measure of the synaptic strength of the NMJs recorded. Nerve-evoked responses were obtained using a stimulation protocol that consisted of 2 stimuli of 10 ms duration elicited at 0.2Hz for a period of at least 10 minutes (120 repetitions). The interval between stimuli was 10 ms. PPF was considered to be the mean amplitude of the second EPP divided by the mean amplitude of the first EPP (10 minutes period). Quantal content was calculated using the method of mEPPs originally presented by Castillo and Katz (1954):  $m$  = mean amplitude of the first EPPs (including failures) / mean amplitude of the mEPPs. At least 100 mEPP were included in the calculation of  $m$ .

In order to identify previously recorded NMJs in the SOL muscle for the fiber type classification, preparations were incubated right after the physiological experiment for 10 minutes with  $\alpha$ -Bungarotoxin (Alexa594, 1.3-2.0  $\mu\text{g/ml}$ , Invitrogen), a natural toxin that specifically binds and blocks acetylcholine receptors at the NMJ. The particular pretzel-like pattern of each NMJ revealed by this staining being unique, imaging with this technique allows us to retrieve any NMJ recorded with great certainty, even after performing

immunohistochemistry. Additionally, to furthermore ensure an accurate *post hoc* identification, surrounding fibers were gently impaled with a sharp microelectrode in a characteristic way to make the NMJ even more salient and eventually use it as a map. The number of fibers separating the NMJ from the main nerve entry was also counted and serves as a supplemental reference. Images on live muscles were then acquired on an Olympus U-TV1XC with a BrightLine Pinkel filter set (Single band exciter FF01-560/25).

#### *Immunohistochemistry and fiber type identification*

The SOL is a slow-twitch muscle containing mainly two fiber types in mice: S fibers expressing the myosin heavy chain I (MHCI) and FR fiber expressing the myosin heavy chain IIa (MHCIIa). To identify the two different MHC as well as the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors, triple staining was performed on Soleus muscle after each physiological experiment (see Fig. 2.2B). Muscles were first fixed with 4% formaldehyde diluted in PBS 1X solution (in mM : 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) during 10 minutes, and rinsed three times with PBS 1X. Then, permeabilisation was performed with cold Methanol for 6 minutes at a temperature of -20°C. The rest of the immunostaining was done at room temperature. Next, muscles were washed 3 times with PBS-1X. To prevent non-specific labelling by antibodies, muscles were then incubated in a PBS IX-Triton 0.01X solution containing 10% Normal Donkey Serum (NDS) for 20 minutes. The following primary antibodies were then used for the first incubation (2 hours): a mouse anti-MHC type I IgG2B and the mouse anti-MHCIIa IgG1 (BAD5C, 1:100 and SC-71c, 1:200, Developmental Studies Hybridoma Bank). Muscles were subsequently washed three times (5 min each) in PBS-Triton 0.01x, same as between every following step of the immunohistochemistry. The first secondary antibody used was the goat Alexa647  $\alpha$ -mouse IgG2b (1:500, Jackson ImmunoResearch), for 1 hour at room temperature. Then, SOL preparations were incubated with the Alexa488 goat  $\alpha$ -mouse IgG1 (1:500, Jackson ImmunoResearch). Finally, a 30 minute staining with an Alexa594-conjugated- $\alpha$ -BTX (1.33-2.0  $\mu$ g/ml, Invitrogen) was performed to label postsynaptic receptors. Afterwards, muscles were mounted on a glass slide in Prolong

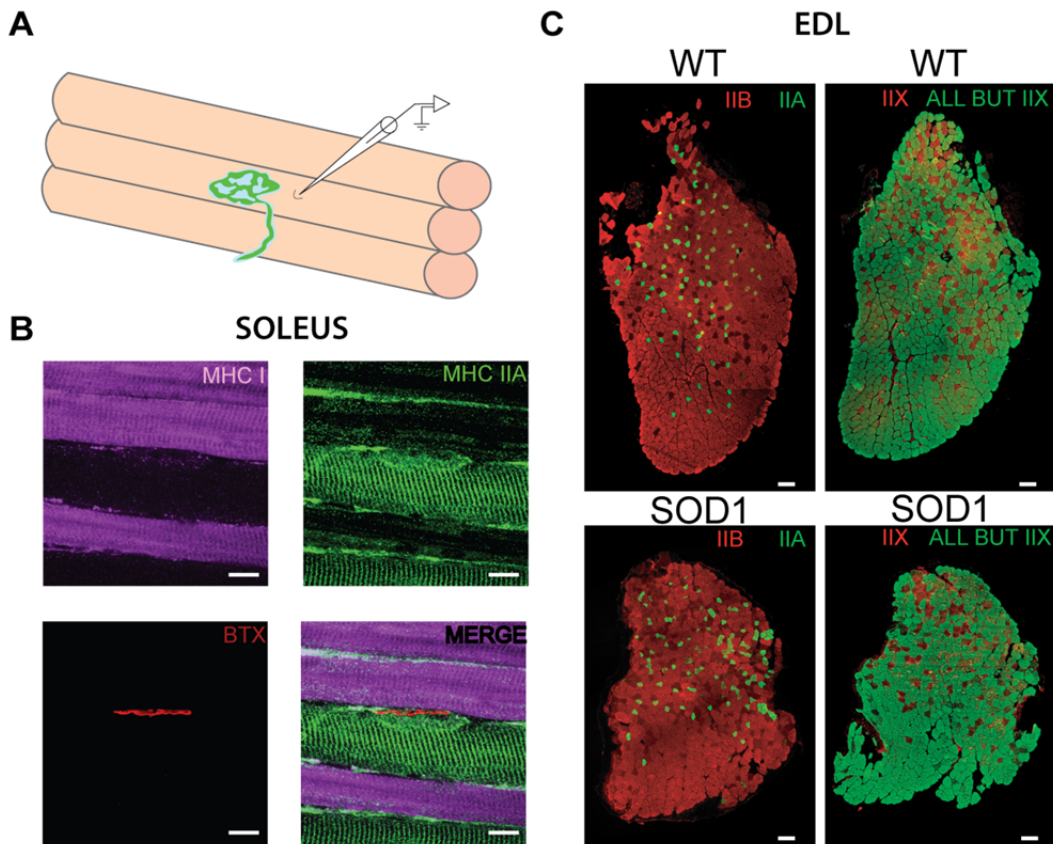
Gold antifade (Invitrogen). Images were subsequently acquired using a Zeiss LSM microscope.

Immunolabelling on cross-sections of the EDL was performed similarly to what was previously described (Gouspillou et al., 2014). Briefly, the dissected EDL muscle was mounted in cold optimal cutting medium compound (OCT; TissueTek). Muscles were then frozen in isopentane cooled to -80°C in liquid nitrogen. Transverse cryosections (10 µm) were made and incubated in blocking solution (10% NDS in PBS). Sections were incubated with either mouse IgG1 anti-MHC type IIa (SC-71, 1:200), mouse IgG2b anti-MHC type I (BA-D5, 1:100) and mouse IgM anti-MHC type IIb (BF-F3, 1:200) or mouse IgM anti-MHC type IIx (6H1; 1:10) and mouse IgG1 anti-MHC all but IIx (BF-35, 1:200) for 1h at room temperature (all from Developmental Studies Hybridoma bank). Sections were then rinsed in PBS three times, and incubated with secondary antibodies goat anti-mouse IgG1 Alexa488, goat anti-mouse IgM Alexa405 and goat anti-mouse IgG2b Alexa647 (all 1:500, Jackson ImmunoResearch). Sections were then mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen).

Finally, to label the three synaptic compartments of the NMJ, triple immunolabelling was performed as previously described (Arbour et al., 2015; Darabid et al., 2013). Muscles were first dissected in Normal Ringer's Rees solution, in a sylgard-coated petri dish. Then, EDL and SOL muscles preparations were fixed at room temperature in a PBS 1X buffer with 4% formaldehyde for 10 min. After, muscles were permeabilized in 100% cold methanol at -20°C for 6 min. To prevent nonspecific labeling, preparations were incubated for 20 min at room temperature with 10% normal donkey serum (NDS) diluted in PBS-Triton (containing 0.01 % Triton X-100).

Schwann cells were first labeled for 2 hours with a rabbit anti-S100β antibody (1:250, Dako), at room temperature in PBS containing 2% NDS and 0.01% Triton X-100. Then, muscles were washed three times (5 min each) in PBS-Triton 0.01x, same as between each incubation of the immunohistochemistry. Next, axons (chicken anti-neurofilament M, NF-M, 1:2000, Rockland Immunochemicals Inc) and nerve terminals (mouse IgG1 anti-synaptic vesicular protein 2, SV2, 1:2000, Developmental Studies Hybridoma Bank) were labeled for 2 hours. Muscles were then incubated with three secondary antibodies for 1 hour, goat anti-mouse IgG1 Alexa488, donkey anti-chicken Alexa448 and donkey anti-rabbit Alexa647

(1:500, Jackson ImmunoResearch). To label postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), Alexa594-conjugated- $\alpha$ -BTX (1.33-2.0  $\mu$ g/ml, Invitrogen) was incubated with muscles for 30 min. Finally, whole muscle preparations were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen). Observations and image acquisition were done on Zeiss LSM 510 confocal microscope. No image manipulations were performed after acquisition.



**Figure 2.2** *Recording method and fiber type identification in the SOL and the EDL. A*, Schematic representation of the electrophysiological recording method that was performed with a sharp microelectrode, at a 20-30 $\mu$ m distance from a visualised NMJ. **B**, Confocal false color images showing fiber type identification and labeling of the SOL muscle: S NMJs (MHC 1, purple), FR NMJs (MHC IIA, green) and nAChRs ( $\alpha$ -Bungarotoxin). The two MU types FF and FR alternate at the surface of the SOL muscle. **C**, Transverse cross-sections of the EDL muscle, at P380, showing fiber types labeling of three MHC. Left panels, MHC IIA (in green) and MHC IIB (in red), right panels : MHC all but IIX (in green) and MHC IIX (by extension, in

red). Note the clear atrophy of the mutant EDL in the bottom panel. Scale Bars: **B**, 10  $\mu\text{m}$ ; **C**, 100  $\mu\text{m}$ .

### *Statistical analysis*

In this study, results are always represented as mean  $\pm$  SEM (the number of animals is identified as  $N$  and the number of NMJs is represented by  $n$ ). In most cases where two different groups were compared, unpaired  $t$  test were used. In addition, *two-way ANOVA* with *post hoc* Bonferonni multiple Comparison Test was used to compare the values obtained for the three MU of SOD1 and WT mice. The confidence level used was always of 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

For the morphological analysis, a Generalized Linear Model (GLM) with a quasi-binomial error structure was used. This approach was used as it does not assume that the variance is constant and normally distributed (normal error structure) across all conditions, contrary to standard statistical tests. When counting the number of observations (NMJs) positive for a qualitative criterion and expressing it as a proportion of the total sample (as is the case here), the variance does not respect the aforementioned assumptions. Indeed, as this proportion can only vary between 0% and 100%, the closer it is to those extremes, the smaller and the more asymmetrical the variance becomes (Crawley, 2007). All analyses were made with the “R Studio” software. The number of animals used ( $N$ ; number of replicates) and the number of NMJs ( $n$ ; number of observations) are indicated in the text.

## **2.4 Results**

Considering the differential susceptibility to the disease of different MU in ALS (Atkin et al., 2005; Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006), we postulated that previous inconsistencies seen in synaptic transmission at the NMJ in various ALS models might be explained in part by the differential effect of the mutation on the MU types. We therefore tested in the present work if spontaneous and potential-evoked activity were altered in the slow-twitch SOL and the fast-twitch EDL, in a MU specific manner,

throughout the disease course. In addition, we hypothesized that the possible synaptic alterations presented by the various NMJ types (S-FR-FF) might be transient and evolve differently as disease progress. Hence, to this end, we used a slow and progressive model of ALS, the SOD1<sup>G37R</sup> mouse, to investigate specifically three definite time periods to dissect the temporal effect of SOD1 mutation on neuromuscular transmission, the asymptomatic stage (P160), the presymptomatic (preonset) stage (P380) as well as disease onset (P425) (see Fig. 2.1 for details). In order to better describe and evaluate synaptic variations occurring at NMJs in ALS, we developed a MU Synaptic Profile (MUSP) based on the characteristics of WT spontaneous and evoked neurotransmission at P160. This represents a way to address the question of synaptic transmission at the NMJ in ALS and to not only show if the SOD1 NMJs present differential synaptic alterations compared to WT NMJs but also if they respect the gradient of intrinsic synaptic properties expected in the various MU.

#### *MU types and fibers types of EDL and SOL muscles*

To precisely identify the MU type of every recorded NMJ, we took advantage of the fact that the different MU are associated with different fiber types, that can be easily determined by immunostaining of their respective Myosin heavy chain (MHC I, IIa, IIx and IIb). We therefore first performed immunolabeling for the different MHC (IIa, IIB and IIx) on transverse cryosections (10µm) of the EDL muscle. We found that even if the EDL is a fast-twitch muscle containing a mixture of different fast fibers, expressing mostly MHC IIB and MHC IIx (Augusto et al., 2004), the specific zone on the muscle surface where NMJs were recorded in the EDL was composed only of MHC IIb fibers (see example in Fig. 2.2C). In contrast, immunolabelling was necessary after each physiological experiment to identify the FR (MHCIIa) and the S NMJs (MHC I) of the SOL muscle (see Fig. 2.2B), as they are present in similar proportion in WT and SOD1<sup>G37R</sup> mice at the surface of this muscle (Arbour et al., 2015).

*Spontaneous activity is unaltered in the three MU of the SOL and the EDL at P160*

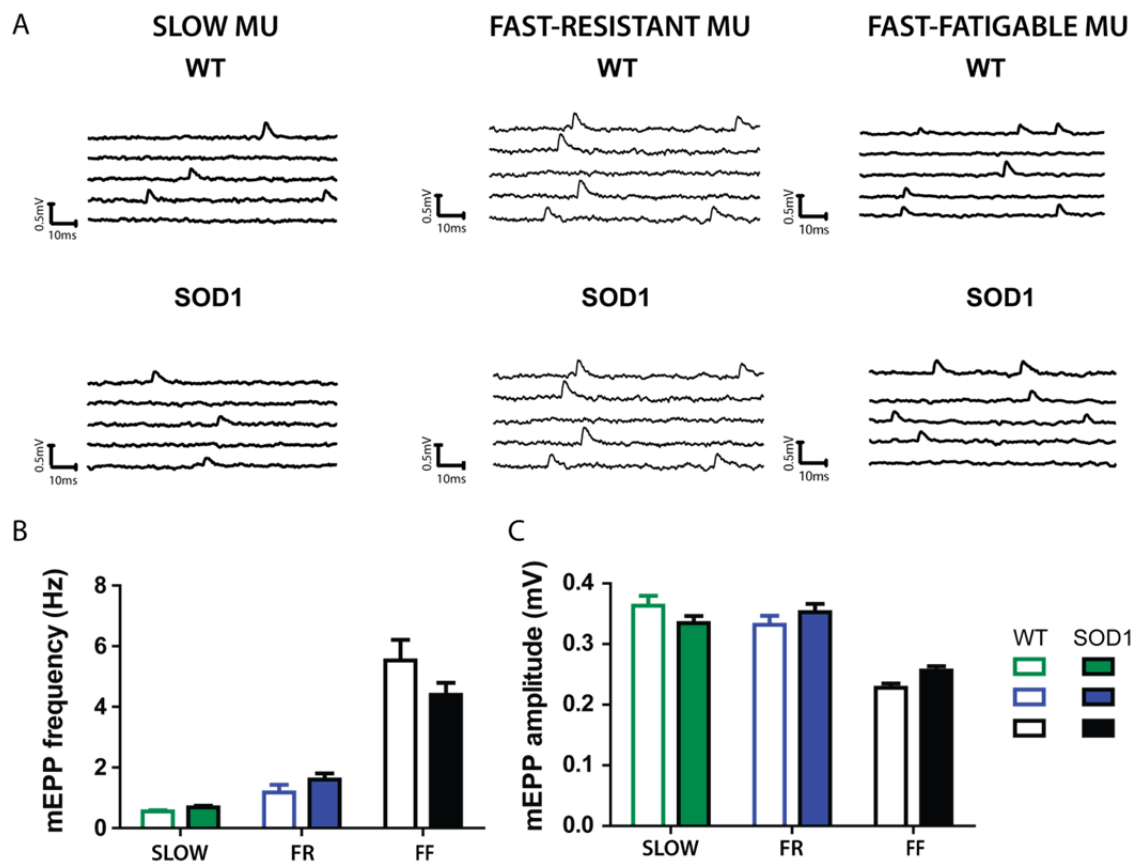
Analysis of spontaneous release can provide useful information on the function of the nerve terminal of an NMJ. Hence, frequency and amplitude of spontaneous events was included in our characterisation of the MUSP. Spontaneous neurotransmission was first recorded at P160 in the SOL and EDL muscle of WT and SOD1<sup>G37R</sup> mice. As expected, at this age, several months before the start of overt motor symptoms, there was no evidence of morphological alterations in the SOD1<sup>G37R</sup> NMJs, neither in the SOL as previously described (Arbour et al., 2015) or in the EDL (data not show).

To first verify if spontaneous activity would be altered as a function of MU type in the WT mice, we characterised spontaneous activity for the three MU S, FR and FF. Fig. 2.3 shows that MU type was significantly affecting the results (*two-way ANOVA*,  $F = 66.52$ ,  $p < 0.0001$ ). Indeed, in WT mice, a similar and predictive pattern was observed where S NMJs showed the lowest mEPP frequency (Fig. 2.3B; WT S,  $n = 14$ ,  $N=9$ ), followed by the FR NMJs (Fig. 2.3B; WT FR,  $n = 9$ ,  $N=7$ ) and finally the FF NMJs, that showed the highest spontaneous mEPP frequency (Fig. 2.3B; WT FF,  $n = 18$ ,  $N=9$ ). Importantly, the same pattern was observed in the SOD1 mice, without any difference compared to the control NMJs (Fig. 2.3B; SOD1 S:  $n=13$   $N=8$ ; SOD1 FR:  $n=14$ ,  $N=8$ ; SOD1 FF:  $n=23$ ,  $N=12$ , *two-way ANOVA*,  $p > 0.05$ ). This is consistent with a previous report of unaltered spontaneous transmitter release at a presymptomatic stage in the SOD1<sup>G93A</sup> mouse diaphragm (Rocha et al., 2013).

We next investigated the amplitude of the spontaneous events, knowing that this variable is usually inversely correlated with fiber diameter, which varies between different MU types (Sieck and Prakash, 1997). Alterations of this criterion could potentially highlight some postsynaptic defects in the mutant mice. We predicted that there would be a gradual increase in mEPP amplitude from the fast to the slow MU in WT mice, as a result of the decreasing fiber diameter. Interestingly, mEPP amplitude varied as a function of the MU type (*two-way ANOVA*,  $F = 70.20$ ,  $p < 0.0001$ ). In the WT, a predictive pattern was again observed where the FF MU had the smallest mEPP amplitude and FR MU and S MU had the greatest mEPP amplitude (Fig. 2.3C; WT S,  $n = 13$ ,  $N=7$ ; WT FR,  $n = 8$ ,  $N=6$ ; WT FF,  $n = 21$ ,  $N=9$ ,



two-way ANOVA,  $p < 0.001$ ). There was no significant difference between the SOD1 and the WT mice, since mutant NMJs followed approximately the same pattern (Fig. 2.3C; SOD1 S,  $n=12$ ,  $N=8$ ; SOD1 FR,  $n=11$ ,  $N=8$ ; SOD1 FF,  $n=31$ ,  $N=14$ , two-way ANOVA,  $F = 0.5142$ ,  $p > 0.05$ ). At this age, the presence of giant mEPPs ( $> 1$  mV) was not a predominant characteristic in any MU preparations studied, in contrast to a previous report in the SOD1<sup>G93A</sup> diaphragm (Rocha et al., 2013). Giant mEPPs were in fact rarely seen (less than 1 event per 5 min recording period) in both WT and SOD1 mice, and only in S NMJs of the SOL muscle.



**Figure 2.3** Spontaneous activity is unaltered in S, FR and FF NMJs at P160 in the SOD1<sup>G37R</sup> mouse. **A**, Typical traces of miniature endplate potential (mEPP) based on a 5 minute recording period without any motor nerve stimulation, for the slow (S, left), the fast-fatigue resistant (FR, center) and fast-fatigable (FF, right) NMJs of WT and SOD1<sup>G37R</sup> mice. Histograms showing the mean  $\pm$  SEM of mEPP frequency (**B**) and mEPP amplitude (**C**) for S

(in green), FR (in blue) and FF NMJs (in black). Note the gradual increase in mEPP frequency as a function of the MU type, which is similar for both WT and SOD1<sup>G37R</sup> NMJs.

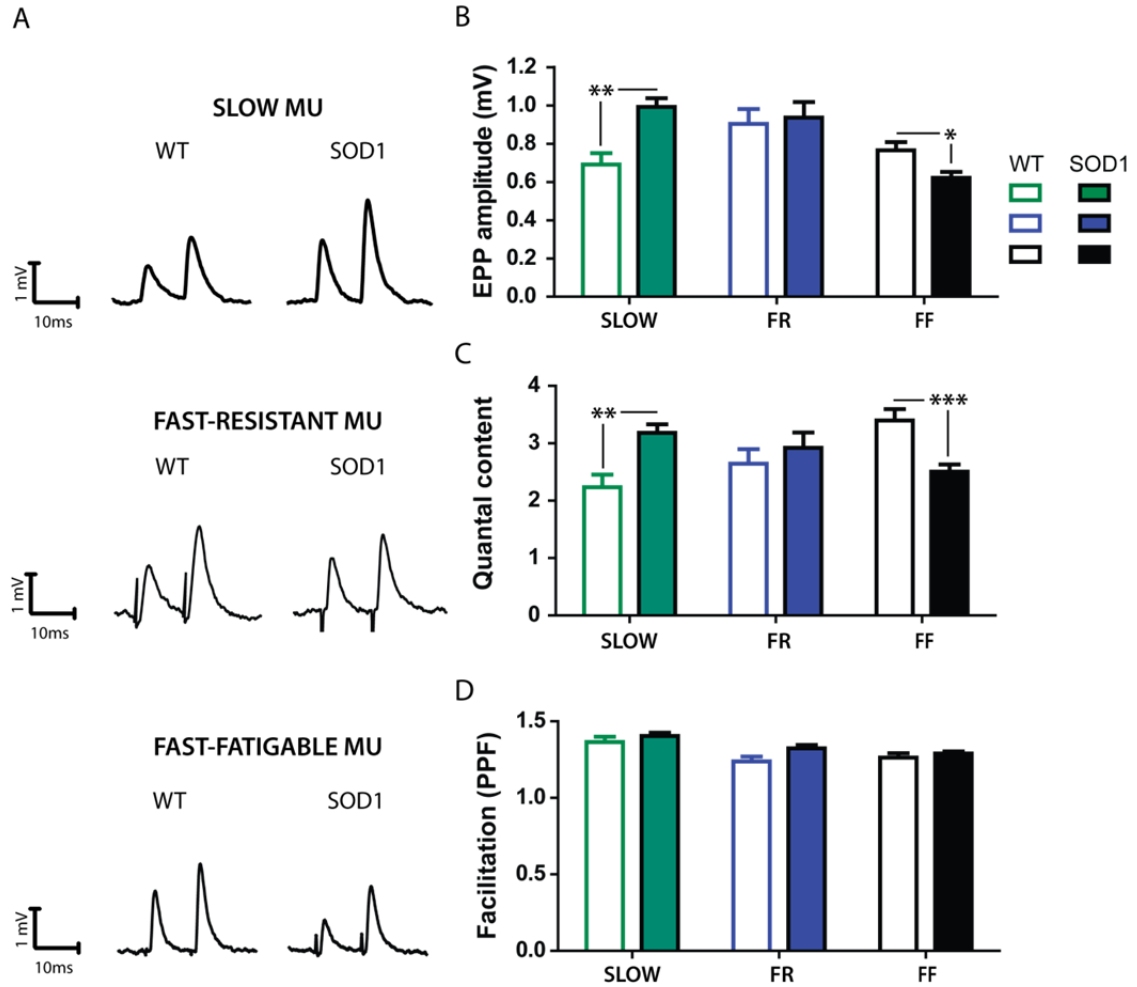
*Evoked activity is increased in S MU of the SOL and decreased in FF MU of the EDL at P160*

Nerve-evoked activity and the level of transmitter release are important indicators of the general state of the NMJ and are crucial to elicit voluntary muscle contraction. We therefore tested the hypothesis that evoked transmission might be altered in a MU specific manner at P160 in the SOD1<sup>G37R</sup> mouse model. We performed standard electrophysiological recordings using a paired-pulse stimulation (PPF) protocol of two stimuli (0.1 ms duration and 10 ms interval) elicited at 0.2 Hz. We classified the results according to the MU types to complete our characterisation of the parameters of the MUSP in WT as well as in SOD1 NMJs.

Amplitude of endplate potentials (EPP) following stimulation of the tibial nerve (SOL) and the deep peroneal nerve (EDL) was first measured, using the mean amplitude of the first EPP during the PPF protocol. In the WT SOL, EPP amplitude was the smallest in S MU (Fig. 2.4A and B; n= 11, N=8), significantly smaller than FR MU (Fig. 2.4A and B; WT FR, n= 10, N=8, *two-way ANOVA*,  $p < 0.05$ ). FF MU showed an intermediate EPP amplitude (WT FF, n=31, N=12). In addition to the fact that MU type significantly affected the results (*two-way ANOVA*,  $F = 10.52$ ,  $p < 0.05$ ), a significant interaction effect between genotype and MU type was revealed (*two-way ANOVA*,  $F = 9.560$ ,  $p < 0.05$ ). Indeed, EPP amplitude was 43% larger in mutant S NMJs than WT S NMJs (Fig. 2.4A and B; SOD1 S, n=16, N=9, *two-way ANOVA*,  $p < 0.01$ ). Conversely, EPP amplitude was 19% smaller in the FF NMJs of SOD1 mice (Fig. 2.4A and B; SOD1 FF, n=31, N=12, *two-way ANOVA*,  $p < 0.05$ ). Finally, regarding SOD1 FR NMJs, no alterations of EPP amplitude were detected in comparison with WT mice (Fig. 2.4A and B; SOD1 FR, n=14, N=9, *two-way ANOVA*,  $p > 0.05$ ).

Next, we determined quantal content ( $m$ ), an important indicator of the strength of a synapse, which refers to the number of vesicles released per nerve stimulation. Based on the well-known differences in MU functions and synaptic properties (Kanning et al., 2010; Reid et al., 1999), we predicted a gradient of  $m$  in WT mice, from S to FF NMJs. Data obtained

partially confirmed this hypothesis, since S NMJs showed the smallest  $m$  (Fig. 2.4C; *two-way ANOVA*,  $p < 0.01$ ) compared to FF NMJs that presented the largest  $m$  (Fig. 2.4C, WT S,  $n=13$ ,  $N=9$ , WT FF,  $n=21$ ,  $N=11$ , *two-way ANOVA*,  $p < 0.001$ ). FR NMJs showed an intermediate one, but not significantly different from the others (Fig. 2.4C, WT FR,  $n=11$ ,  $N=9$ , *two-way ANOVA*,  $p > 0.05$ ). Then, we hypothesized that  $m$  of SOD1 NMJs might be altered in the different MU during pathogenesis. Indeed, well before the onset of motor symptoms, opposite and unexpected synaptic changes were already prominent in the S fibers of the SOL and the FF fibers of the EDL, reversing the normal physiological properties observed in WT NMJs. In fact, the presence of the mutation influenced the MU types differently (*two-way ANOVA*,  $F = 12.98$ ,  $p < 0.0001$ ), whereby the S MU of the SOD1<sup>G37R</sup> SOL presented a 42% increase in the mean  $m$  compared to WT (SOD1 S,  $n=12$ ,  $N=8$ , *two-way ANOVA*,  $p < 0.01$ ). In addition,  $m$  was reduced by 36% in the FF NMJs of the mutant mice (SOD1 FF,  $n=29$ ,  $N=14$ , *two-way ANOVA*,  $p < 0.001$ ).

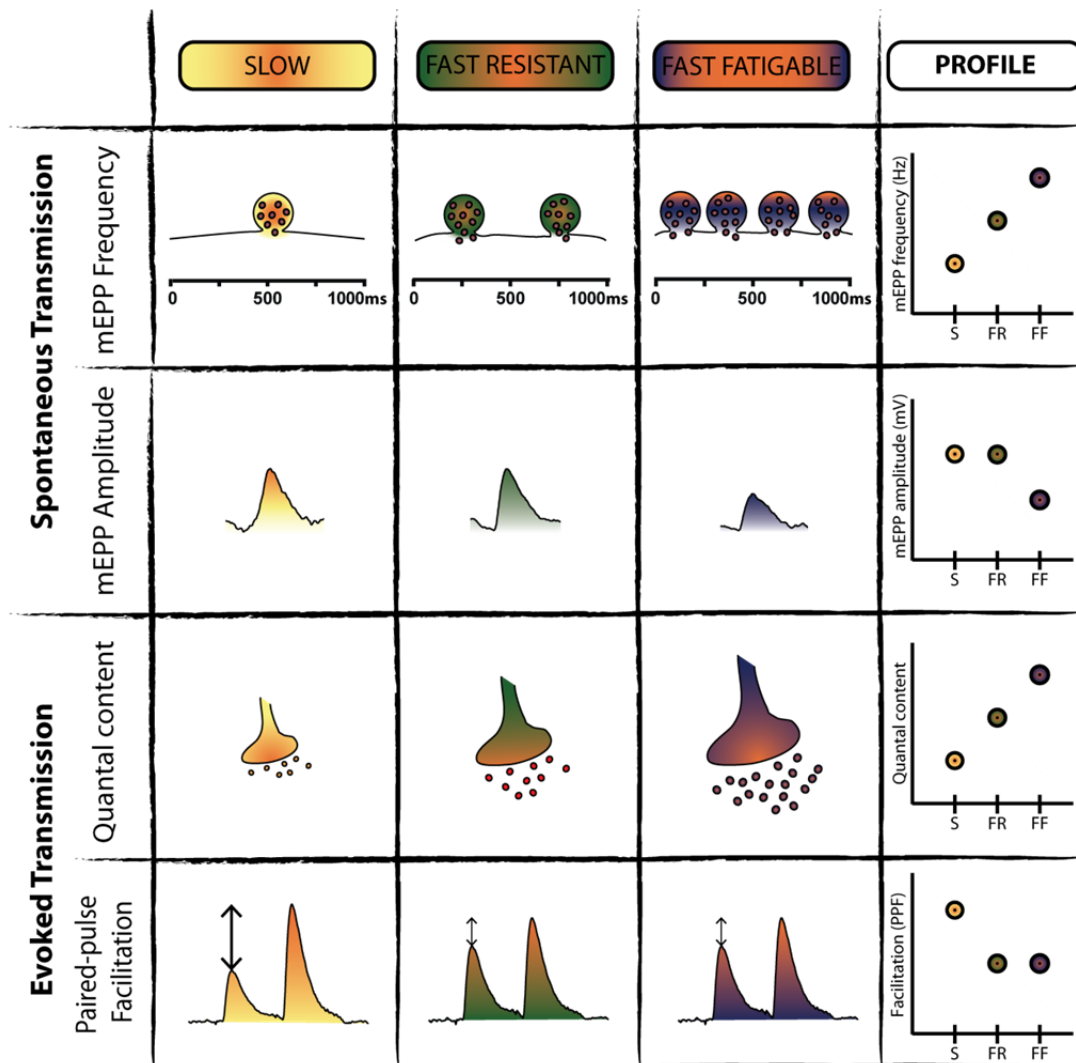


**Figure 2.4.** EPP amplitude and quantal content are significantly increased in S NMJs and decreased in FF NMJs of *SOD1<sup>G37R</sup>* mice at P160. **A**, Example traces of nerve-evoked endplate potential (EPP) following a paired-pulse facilitation protocol elicited at 0.2 Hz, for the S (top), the FR (middle) and FF NMJs (bottom) of WT and *SOD1<sup>G37R</sup>* mice. Histograms show the mean  $\pm$  SEM of EPP amplitude (**B**), quantal content (**C**) and paired-pulsed facilitation ratio (**D**) of the S (in green), FR (in blue) and FF NMJs (in black) from WT and *SOD1<sup>G37R</sup>* mice. Quantal content was obtained by dividing the mean EPP of the first EPPs, including failures, divided by the mean mEPP amplitude. PPF was calculated as the mean amplitude of the second EPPs divided by the mean amplitude of the first EPPs. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Next, to furthermore gain insight in the release properties of the various MU types, in WT as well as in SOD1 mice, we analysed the paired-pulsed facilitation ratio (PPF). Consistent with the idea that the initial probability of release of a NMJ is normally inversely proportional to the PPF (Mallart and Martin, 1968), we expected to observe MU specific variation of this variable in WT mice, since MU show clear intrinsic variations in evoked transmitter release. We also hypothesized a reduced PPF in SOD1 S NMJs, as well as an increase in the PPF ratio of FF NMJs in SOD1 mice compared to WT, as a consequence of the early alterations of the probability of release presented earlier.

Once again, MU type had the greatest influence on these properties, irrespective of the genotype (*two-way ANOVA*,  $F = 11.63$ ,  $p < 0.0001$ ). Indeed, PPF ratio varied mainly as a function of the MU type for the mutant and the control mice, the PPF ratio being significantly greater in S NMJs than in FR or FF NMJs in WT (Fig. 2.4D, WT S,  $n=10$ ,  $N=8$ , WT FR,  $n=11$ ,  $N=8$ , WT FF,  $n=30$ ,  $N=12$ , *two-way ANOVA*,  $p < 0.05$ ) and in SOD1 mice (Fig. 2.4D, SOD1 S,  $n=16$ ,  $N=9$ , SOD1 FR,  $n=14$ ,  $N=9$ , SOD1 FF,  $n=31$ ,  $N=12$ , *two-way ANOVA*,  $p < 0.05$ ). Surprisingly, although the presence of the mutation significantly affected the results, resulting in a modest increase of the PPF ratio of the three MU types (Fig. 2.4D; *two-way ANOVA*,  $F = 5.60$ ,  $p = 0.0199$ ), PPF ratio was unchanged in SOD1 compared to WT mice in any MU type (Fig. 2.4D; *two-way ANOVA*,  $p > 0.05$ ). This is inconsistent with the known typical physiology of the NMJ, considering the alterations of nerve-evoked activity previously described.

Therefore, integrating synaptic data according to the MU type allowed us to identified specific differences not only between WT and SOD1 but also between FF, FR and S MU. A MUSP was then generated based on the characterization of the synaptic properties of the FF, FR and S NMJs in the WT mice (see Fig. 2.5 for details). This synaptic profile reveals that the various MU type present a continuum of relative properties to one another. This analysis will allow us to better unravel the temporal synaptic evolution of the NMJ during disease progression.



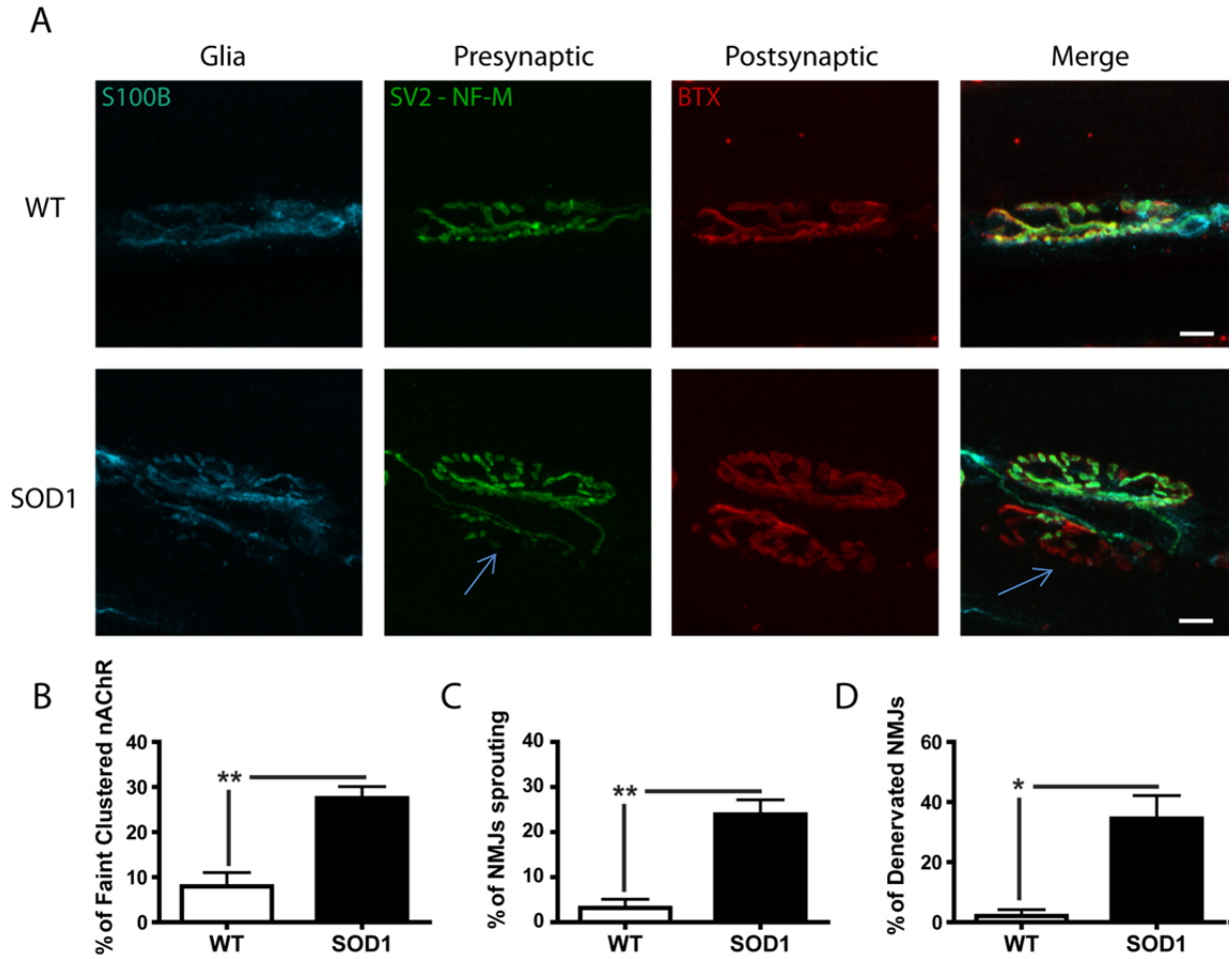
**Figure 2.5** *Motor Unit Synaptic Profile (MUSP) based on WT mice spontaneous and evoked synaptic transmission.* Schematic representation of relative variations in synaptic properties in function of MU type, including S (in yellow), FR (in green) and FF NMJs (purple and orange) characterization. Four parameters are represented in the profile, namely mEPP amplitude and frequency, as well as quantal content and paired-pulse facilitation (PPF). Note the relative gradation of spontaneous and nerve-evoked properties following the continuum of the MU,

based on experimental data, which allowed us to generate an indicative pattern of the properties of the MU relative to each other.

*NMJ morphology is altered at P380 in the EDL muscle*

We previously showed that synaptic transmission was persistently increased at a presymptomatic stage (P380) in the SOL, in S NMJs only (Arbour et al., 2015). We thus investigated specifically the EDL muscle at P380 to characterise synaptic transmission in FF MU at a presymptomatic stage. Since several morphological alterations have already been reported in the SOD1<sup>G93A</sup> mouse before symptom onset, especially in FF MU (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006; Valdez et al., 2012), we expected substantial denervation and postsynaptic changes in the fast-twitch EDL that could impair further synaptic transmission.

We first performed a triple immunolabelling on EDL whole mounted muscle preparations to label the three components of the NMJ: presynaptic terminal, postsynaptic endplate and glia. Each NMJ was analysed according to seven criteria previously described (Arbour et al., 2015) (see Appendix 1 for details). We observed several morphological alterations of the NMJs of mutant EDL. First, denervation and partial innervation (incomplete coverage of the postsynaptic endplate by the nerve terminal) were already noticeable and frequent at this stage in the SOD1<sup>G37R</sup> (see example of partial innervation in Fig. 2.6A, 2.6D, *Generalized Linear Model* (GLM), WT, n=68, N=6, SOD1, n=70, N=5,  $p < 0.01$ ). In comparison, no NMJ was completely denervated in WT muscles at this age. Postsynaptic endplate areas were also more likely to present a diffuse  $\alpha$ -BTX labeling and a clustered appearance in SOD1 mice (Fig. 2.6B, GLM,  $p < 0.01$ ). However, nerve sprouting was observed more frequently in the mutant EDL (Fig. 2.6C, GLM,  $p < 0.01$ ), showing that some regenerative processes occurred in the SOD1 at this stage, consistent with a significant nerve sprouting in the SOD1<sup>G93A</sup> EDL at a symptomatic stage (Valdez et al., 2012).



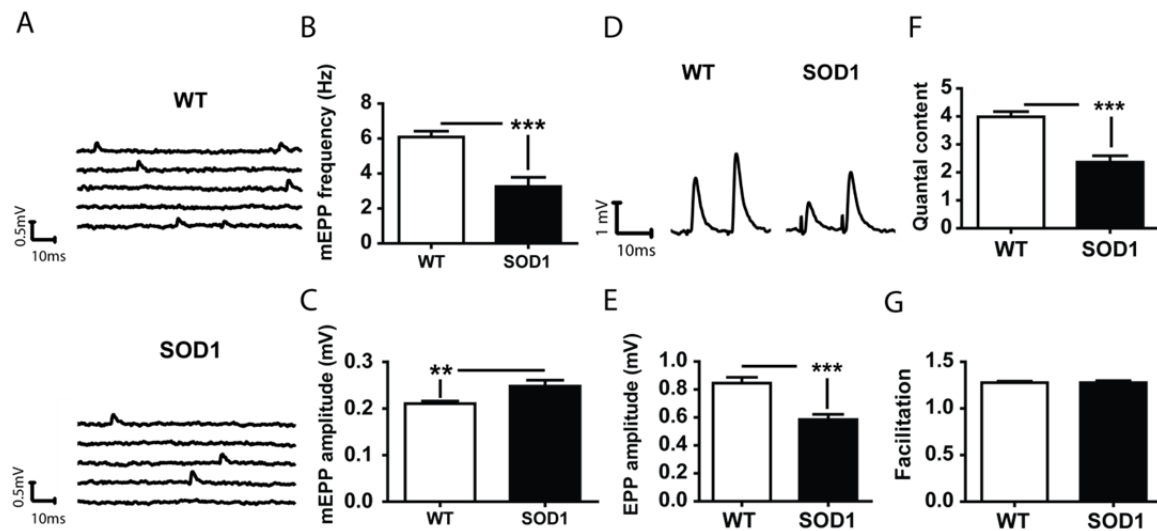
**Figure 2.6** Morphological alterations of FF NMJs are striking at P380 in the EDL muscle, before symptom onset. **A**, Images acquired with a Zeiss LSM microscope showing immunohistochemical labeling of the three components of the NMJ: the perisynaptic Schwann cells (Glia, S100 $\beta$ , in blue), the presynaptic terminal (synaptic vesicles and the neurofilament, SV2 + NF-M, in green) as well as endplate acetylcholine receptors (postsynaptic,  $\alpha$ -BTX, in red), in the WT (upper panel) and SOD1<sup>G37R</sup> mice (bottom panel). Note the presence of a partially innervated NMJ in the SOD1 mice (blue arrows). Histogram showing mean  $\pm$  SEM of the percentage of NMJs with faint clustered nAChRs (**B**), nerve sprouting (**C**) or denervation, including partially innervated and completely denervated NMJs (**D**). GLM, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Scale bar, 10  $\mu$ m.



### *Synaptic properties are persistently altered at P380 in the EDL muscle*

At P380, immunohistochemical analysis has already shown profound morphological alterations that are likely to impair synaptic transmission in the EDL muscle. We performed electrophysiological recordings on the presymptomatic SOD1<sup>G37R</sup> mice (P380). Spontaneous neurotransmission was now significantly changed in the EDL, as opposed to P160. Indeed, mEPP frequency was considerably decreased in SOD1 mice (Fig. 2.7B; WT,  $n=15$ ,  $N=8$ ; SOD1,  $n=11$ ,  $N=7$ , *unpaired-t-test*,  $p < 0.001$ ). Additionally, mEPP amplitude was increased at this stage in the SOD1 mice compared to the WT mice (Fig. 2.7C; WT,  $n=18$ ,  $N=9$ ; SOD1,  $n=29$ ,  $N=10$ , respectively, *unpaired-t-test*,  $p < 0.01$ ).

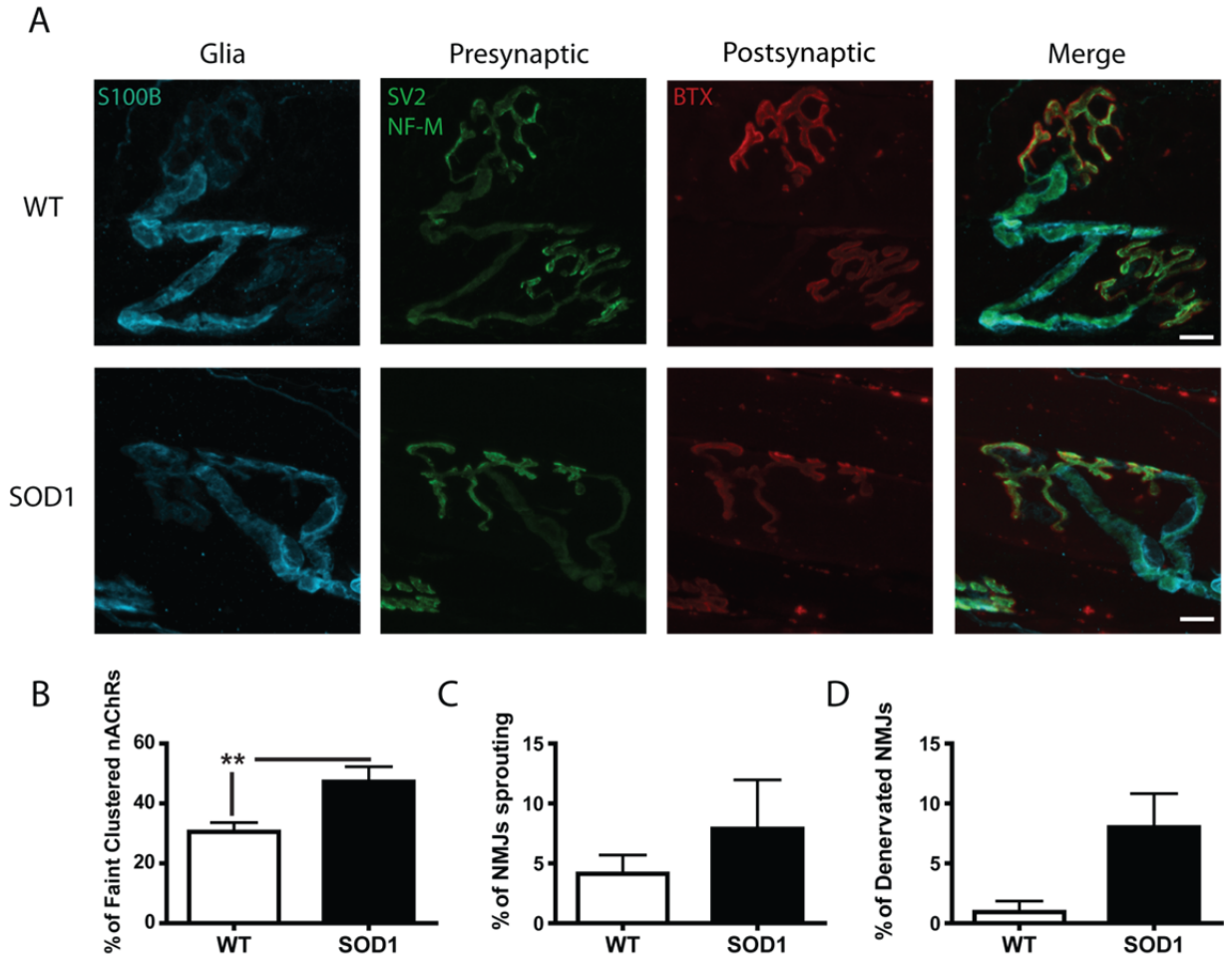
On the other hand, nerve-evoked activity remained persistently altered. A marked decrease of 31% was observed in EPP amplitude of the SOD1 FF fibers (Fig. 2.7D and E; WT:  $n=35$ ,  $N=11$ ; SOD:  $n=25$ ,  $N=11$ , *unpaired-t-test*,  $p < 0.0001$ .), similar to the data obtained at P160. Additionally,  $m$  was still considerably reduced at this age (Fig. 2.7F; WT,  $n=29$ ,  $N=10$ , SOD1,  $n=18$ ,  $N=9$ , *unpaired-t-test*,  $p < 0.0001$ ). No significant difference was observed in PPF values between WT and SOD1 (Fig. 2.7; WT:  $n=35$ ,  $N=11$ ; SOD:  $n=25$ ,  $N=11$ , *unpaired-t-test*,  $p > 0.05$ ).



**Figure 2.7** *Persistent quantal content reduction in the EDL at P380 is accompanied by alterations in spontaneous activity. A*, Examples of miniature endplate potentials (mEPP) in control (WT) and SOD1<sup>G37R</sup> mice. Histograms show mean  $\pm$  SEM of spontaneous transmitters release in FF NMJs, including mEPP frequency (**B**) and mEPP amplitude (**C**) of miniature events. **D**, Traces of EPPs from WT and SOD1 FF NMJs. Histograms show mean  $\pm$  SEM of EPP amplitude (**E**), quantal content (**F**) and paired-pulse facilitation ratio (PPF, **G**). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

*SOD1<sup>G37R</sup> SOL muscle shows only minor morphological alterations at disease onset*

Knowing that disease onset is relatively late in the SOD1<sup>G37R</sup> as compared to the SOD1<sup>G93A</sup>, occurring at around P420-450 (see Fig. 2.1 for the time course of the disease), we investigated synaptic transmission in the SOL after disease onset, to see if the persistent synaptic changes would still be there in this period when overt motor symptoms and muscle atrophy are ongoing. Since the SOL is a slow-twitch muscle considered to present a late degeneration in ALS, we first examined if morphological alterations were present at this stage. We performed a similar immunostaining as described previously for the EDL to label the three components of the NMJ in SOL muscle. Again in the mutant, postsynaptic endplates were also more likely to have a lack of organisation, a diffuse labeling by  $\alpha$ -BTX and clustered nAChRS (Fig. 2.8B, WT,  $n=122$ ,  $N=4$ , SOD1,  $n=126$ ,  $N=6$ , GLM,  $p < 0.05$ ), indicating ongoing degeneration of the postsynaptic endplate of NMJs. Twelve NMJs out of 126 were partially innervated in the mutant SOL as opposed to only one in the control out of 122 NMJs (Fig. 2.8B). A substantial number of the SOD1 NMJs were relatively spared in these muscles, showing a well-preserved nerve terminal apparatus and presynaptic component and complete glial coverage by the PSCs, consistent with the relative resistance of this muscle to denervation in ALS (Valdez et al., 2012).



**Figure 2.8** At clinical disease onset (P425), NMJs of the SOL show only mild morphological alterations in the *SOD1<sup>G37R</sup>* mice model. **A**, Confocal false color images. Labeling of the three synaptic compartments of the NMJ: glia (S100 $\beta$ , cyan), presynaptic nerve terminal (NF-M and synaptic vesicle protein 2, green) and postsynaptic endplate (nAChRs) ( $\alpha$ -bungarotoxin, red) for SOL NMJs. Immunohistochemical analysis of the three components was done following 7 defined criteria (Appendix 1). Histograms showing the mean  $\pm$  SEM of the percentage of NMJs with a clear lack of organisation and faint clustered nAChRs (**B**), nerve sprouting (**C**) and denervation (**D**). GLM, \*\*  $p < 0.01$ .

### *Spontaneous activity is still unaltered after disease onset in the SOL*

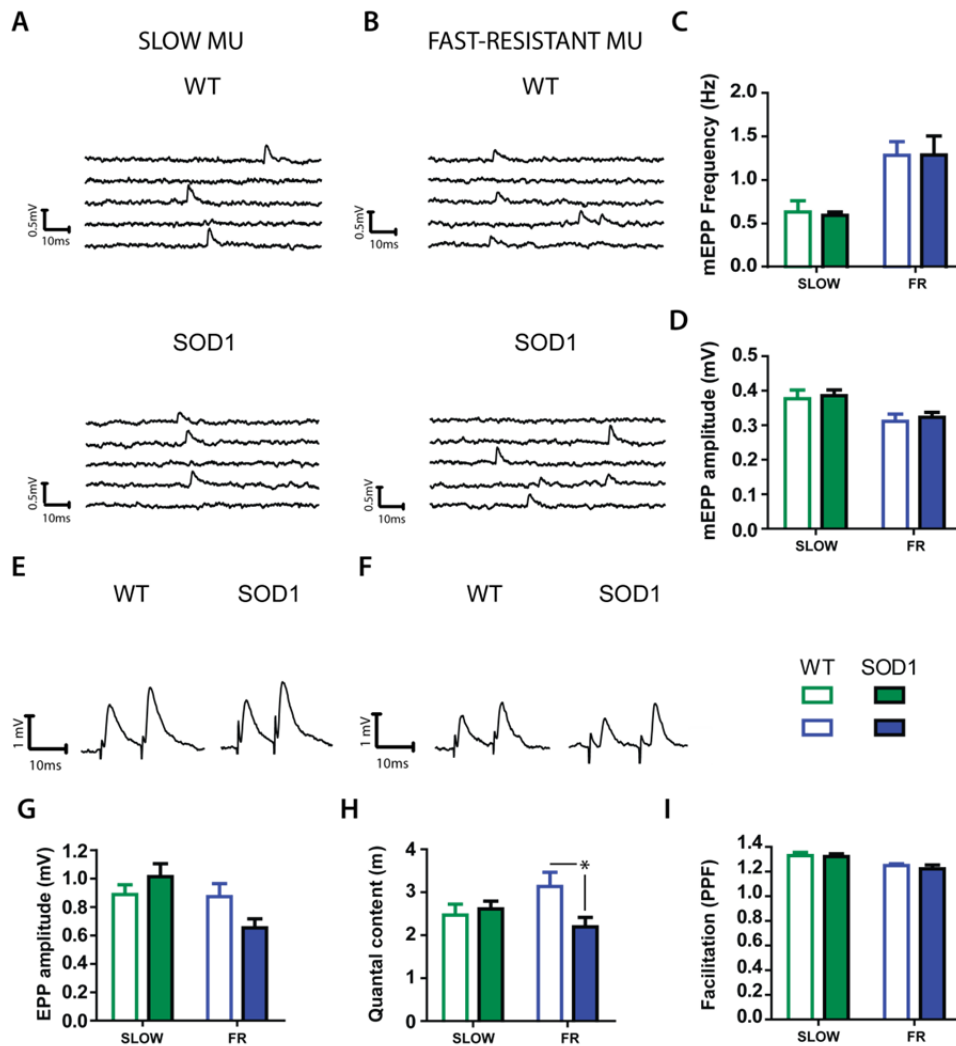
Our next question was to verify if the alterations of synaptic transmission in the SOL would persist until onset. Regarding spontaneous neurotransmission, as predicted by the MUSP, significant differences were observed in mEPP frequency in S MU and FR MU (*two-way ANOVA*,  $F = 22.51$ ,  $p < 0.001$ ). Indeed, mEPP frequency was significantly higher in FR NMJs than S NMJs, for the WT as well as for the SOD1 mice (Fig. 2.9A, B and C; WT FR:  $n = 7$ ,  $N = 5$ ; SOD1 FR:  $n = 8$ ,  $N = 5$ ; WT S,  $n = 8$ ,  $N = 5$ ; SOD1 S,  $n = 10$ ,  $N = 6$ , respectively, *two-way ANOVA*,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ). Concerning mEPP amplitude, there was again a clear effect of the MU type (*two-way ANOVA*,  $F = 10.66$ ,  $p = 0.0025$ ) on this variable, the S NMJs generally presenting a higher mEPP amplitude than the FR NMJs in WT mice (Fig. 2.9D; WT S,  $n = 11$ ,  $N = 6$ ; WT FR,  $n = 9$ ,  $N = 6$ ; *two-way ANOVA*,  $p < 0.01$ ). There was no difference between WT and SOD1 (SOD1 FR:  $n = 7$ ,  $N = 5$ ; SOD1 S,  $n = 11$ ,  $N = 6$ ,  $p > 0.05$ ). Consistent with the data obtained at P160, basal activity was still unchanged in the mutant, without any change in mEPP frequency for the WT NMJs as compared to the SOD1 NMJs (Fig. 2.9C; respectively, *unpaired-t-test*,  $p > 0.05$ ).

### *Nerve-evoked activity evolved differently in MU types of the SOL at disease onset*

Surprisingly, at P430, contrary to the long-lasting changes found in the FF MU of the EDL, none of the MU dependent nerve-evoked synaptic alterations previously reported in the SOL was persistent. Indeed, EPP amplitude at P430 was not significantly different between WT and SOD1 in S MU (Fig. 2.9E and G;  $n = 14$ ,  $N = 7$ , SOD1:  $n = 12$ ,  $N = 7$ , *two-way ANOVA*,  $p > 0.05$ ). Unexpectedly, a significant interaction effect was observed (*two-way ANOVA*,  $F = 4.24$ ,  $p = 0.0460$ ), as the presence of the mutation affected differently EPP amplitude of FR MU. Indeed, EPP amplitude of FR NMJs was now lower as compared to WT FR NMJs (Fig. 2.9F and G; WT,  $n = 11$ ,  $N = 7$ , SOD1,  $n = 8$ ,  $N = 6$ , *two-way ANOVA*,  $p = 0.05$ ).

At this age, WT mice still presented a specific pattern of synaptic properties in accordance with the MUSP (see figure 2.5). This led to the most striking synaptic change observed at this time period:  $m$  was now considerably reduced by 30% in SOD1 FR NMJs (Fig. 2.9H; WT,  $n = 9$ ,  $N = 6$ , SOD1,  $n = 7$ ,  $N = 5$ , *two-way ANOVA*,  $p < 0.05$ .), while at the same time the increase in neurotransmission reported earlier in mutant S MU had disappeared (Fig.

2.9H; WT:  $2.467 \pm 0.255$ ,  $n = 11$ ,  $N=6$ , SOD:  $2.611 \pm 0.181$ ,  $n = 11$ ,  $N=6$ , *two-way ANOVA*,  $p > 0.05$ ). Finally, again at this age, paired-pulse facilitation was only influenced significantly by the MU type (*two-way ANOVA*,  $F = 12,91$ ,  $p = 0.0009$ ). PPF remained unchanged in SOD1 NMJs as compared to WT NMJs (*two-way ANOVA*,  $p > 0.05$ ). In both cases, S NMJs presented a significantly greater PPF than FR NMJs (Fig. 2.9I; WT S,  $n = 14$ ,  $N=7$ ; SOD1 S,  $n=12$ ,  $N=7$ ; WT FR:  $n = 11$ ,  $N=7$ ; SOD1 FR,  $n=8$ ,  $N=6$ , *two-way ANOVA*,  $p < 0.05$ ), following the pattern identified in the MUSP.



**Figure 2.9** *Quantal content is reduced in FR MU of the SOL at time of clinical disease onset in the mutant SOD1<sup>G37R</sup> mice.* Typical traces of spontaneous events in the S (A) and FR (B) NMJs based on a 5 minute recording period without nerve stimulation for WT and SOD1<sup>G37R</sup> mice. Histograms showing the mean  $\pm$  SEM of mEPP frequency (C), mEPP amplitude (D) for

S (in green) and FR MU (in blue). Traces of EPP amplitude in the S (**E**) and FR MU (**F**) for the control (left) and mutant (right) mice. Histograms showing the mean  $\pm$  SEM of EPP amplitude (**G**), quantal content (**H**) and paired-pulse facilitation (**I**), for S (in green), FR (in blue). Note the reduced quantal content of the SOD1 FR MU compared to the WT.

## 2.5 Discussion

Several important findings derived from the current work. We first developed a MU Synaptic Profile (MUSP) based on WT spontaneous and evoked neurotransmission at P160 that revealed a complete gradient of the synaptic properties of the S, FR and FF NMJs. Second, analysis of synaptic transmission in the SOD1<sup>G37R</sup> mice showed opposite alterations that occur from the asymptomatic stage (P160) until disease onset (P425), completely reversing some patterns of the profile. Indeed, FF MU were characterised by persistent impaired synaptic transmission and S MU by an increase in evoked activity, all preceding morphological alterations of the NMJ. Third, at disease onset (P425), S NMJs no longer presented a larger  $m$  compared to the WT mice, while in contrary, FR NMJs showed a significant reduction in  $m$  at P425. These findings based on an extensive analysis of neurotransmission allowed us to generate a MU Synaptic Profile (MUSP) that identifies clear MU specific synaptic changes that evolved at specific time periods in SOD1<sup>G37R</sup> mice. To our knowledge, this is the first time that an extensive characterisation of spontaneous and evoked neurotransmission parameters is done systematically in the three MU types of the SOL and the EDL, in the WT as in the mutant SOD1 mouse.

*The Motor Unit Synaptic Strength Profile (MUSP) show a clear gradient of intrinsic synaptic properties of the various NMJs*

The MU specific synaptic properties of the WT NMJs used to characterize the MUSP are in perfect accordance with the MN type and the muscle contractile properties. Indeed, the S NMJs, which normally sustain prolong physiological activity and present a tonic firing pattern (Hennig and Lomo, 1985), had the smallest evoked and spontaneous activity,

consistent with their active role in postural movement, their high resistance to fatigue and the slow contractile properties of type I fibers (Purves et al., 2001). In contrary, the FF MU, which need to develop strength and are only transiently active (Hennig and Lomo, 1985), presented the highest mEPP frequency and nerve-evoked synaptic transmission, consistent with their role in developing muscle force. Overall, our data are consistent with the well-known differences between slow and fast NMJs (Reid et al., 1999). This MUSP represented an interesting framework to analyse neurotransmission at the NMJ in ALS and could be used to compare synaptic transmission in other neuromuscular disorders.

*Progressive reduced neurotransmission in fast NMJs highlights their relative vulnerabilities*

The discovery of a reduced neurotransmitter release in FF SOD1 NMJs was expected, as this is frequently reported in motor neuron diseases, like the Lambert-Eaton myasthenic syndrome (Poage and Meriney, 2002), a disorder characterized by muscle weakness caused by the production of antibodies against presynaptic calcium channel at the NMJ. Here, the FF MU of the EDL, that would normally be the strongest according to their intrinsic properties (Kanning et al., 2010), show a reduced  $m$  at P160, when NMJs present a normal morphology. This reduced  $m$  persists at P380, when denervation is frequent in the EDL. Moreover, a clear diminution of  $m$  in FR NMJs at P425, before the appearance of pronounced morphological alterations, indicates that the change in neurotransmission appears to be an early indicator of NMJ malfunction. Hence, the decreased quantal content seems to precede neurodegeneration for FF and FR NMJs, since they precede the extensive NMJ denervation observed in the pathology.

The data presented here are in accordance with a reduced quantal transmission and synaptic fidelity reported in mutTARDBP and mutFUS *zebrafish larvae* (Armstrong and Drapeau, 2013a, b), that were obtained from recordings in muscles that are thought to be the equivalent of vertebrate fast-twitch muscles. Maselli and colleagues also reported NMJs with a low  $m$  in ALS patients (Maselli et al., 1993), which collectively suggests that reduced neurotransmission at the NMJ is a prominent feature of the various forms of ALS. The diminished vesicle release could be explained by an early stalling of vesicles, previously

reported at a presymptomatic stage in fast NMJs of the SOD1<sup>G93A</sup> (Pun et al., 2006). Moreover, impaired axonal transport of acetylcholine transferase in SOD1<sup>G93A</sup> MNs could play a role (Tateno et al., 2009), limiting the synaptic strength of the synapse by reducing neurotransmitter release at the NMJ.

*Increased nerve-evoked transmission observed in S NMJs only*

In this study, NMJs of slow MU, which are thought to be resistant until the end stage and to be the most plastic (Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2007; Hegedus et al., 2008; Pun et al., 2006; Schaefer et al., 2005), in fact show early abnormalities of synaptic transmission. An increase in evoked transmission was observed at P160, lasting until P380 (Arbour et al., 2015). These results are consistent with a population of NMJs presenting an increase in *m* in the presymptomatic SOD1<sup>G93A</sup> mice (Rocha et al., 2013). A possible explanation would be that slower MU are compensating for the progressive weakness of FF MU to attain equilibrium in muscle strength and maintain normal NMJ neurotransmission. Indeed, the profile derived from the MUSP where the S NMJs are the weakest and the FF NMJs are the strongest is totally inverted in the SOD1 mice at P160, without any visible motor symptoms. This suggests that this phenomenon may contribute to a functional homeostasis before symptom onset. Interestingly, a study previously demonstrated that enhancing excitability seems to be an important endogenous mechanism of neuroprotection of the MN during the presymptomatic stage of the disease, and that the relative resilience of S and FR MU could be due to their higher excitability (Saxena et al., 2013). Hence, a possible explanation is that a modulation of excitability occurs during the disease process and that this compensation mechanism explains the enhanced synaptic activity in S MU. It is therefore plausible to think that this phenomenon might play a role in maintaining muscle function and NMJ innervation during the presymptomatic stage. Moreover, in our study, FR MU become weaker at disease onset, at the period when the first signs of vulnerability to neurodegeneration appear in the SOL. We consequently believe that a possible explanation for the opposite synaptic changes reported here are compensational mechanisms that may have an initial neuroprotective effect and might be able to counteract disease progression in our model and delayed disease onset during a certain amount of time.



### *Possible molecular mechanisms influencing neurotransmission in the SOD1 mice*

Interestingly, adenosine, a modulator known to adjust presynaptic acetylcholine release at the NMJ (Sebastiao and Ribeiro, 2009a, b), facilitated evoked neurotransmission by acting on A<sub>2A</sub> receptors both in control and ALS animals (Nascimento et al., 2014). However, the facilitating effect of adenosine on neuromuscular preparations was enhanced only in presymptomatic SOD1<sup>G93A</sup> mice and disappeared after symptoms onset, suggesting that A<sub>2A</sub> receptor function changed with disease progression (Nascimento et al., 2014). We are reporting a substantial increase in neurotransmission in S NMJs, which was no longer present after disease onset. This parallels the evolution of A<sub>2A</sub> receptor activation and its differential effect throughout the disease course, and could contribute to this enhanced evoked transmission. An interaction with A<sub>1</sub> receptors is not excluded, since they mediate synaptic depression (Todd et al., 2010) and downregulate spontaneous neurotransmission at the NMJ (Garcia et al., 2013). This phenomenon could play a role in the significant reduction of spontaneous mEPP frequency at P380 in the EDL.

### *Potential calcium mechanisms explaining the MUSP alterations in SOD1 mice*

It is also plausible that a toxic gain of function of the SOD1 enzyme differentially affects neurotransmission in the disease process, for example by acting on a Ca<sup>++</sup> or Na<sup>+</sup> channel or by modifying calcium homeostasis. Indeed, abnormalities of persistent Na<sup>+</sup> current leading to hyperexcitability of the lumbar motor neurons has already been demonstrated in cultured mutant SOD1 MN at an embryonic and developmental stage (Kuo et al., 2005) as well as in humans (Vucic and Kiernan, 2006). Ca<sup>++</sup> dysregulation in the motor neurons (Siklos et al., 1998) and perturbations of mitochondrial calcium homeostasis are also a prominent feature in SOD1 mice models (Jaiswal, 2014; Jaiswal and Keller, 2009; Tradewell et al., 2011). The consequences of these Ca<sup>++</sup> perturbations may lead to differential outcomes with respect to the MN type, as the S MU present characteristics that make them resistant in neurodegenerative disease (Kanning et al., 2010). Consequently, an increase in Ca<sup>++</sup> could

influence release probability in the S MU, but not in the FF MU because they already present some release machinery problems, for example.

A recent study has shown increased  $\text{Ca}^{++}$  responses to neurotransmission in perisynaptic Schwann cells (PSCs), glial cells at the NMJ, following high frequency stimulation of the nerve terminal of the SOL muscle (Arbour et al., 2015). This  $\text{Ca}^{++}$  elevation increases the release of gliotransmitters and influences synaptic plasticity (Todd et al., 2010). This process could have deleterious impact on the functionality and the plasticity of NMJs. This could in turn lead to long term basal neurotransmission modifications. Early functional alterations of PSCs linked to altered  $\text{Ca}^{++}$  responses could furthermore exacerbate the effect of SOD1 mutation effect on synaptic transmission and synaptic plasticity.

Paired-pulse facilitation ratio (PPF) is another variable clearly influenced by the calcium level inside the nerve terminal. Indeed, an augmentation of the availability of  $\text{Ca}^{++}$  following an action potential facilitate vesicles release for the second stimulation, since the residual calcium is thought to play a significant role in the determination of the PPF ratio (Kamiya and Zucker, 1994; Katz and Miledi, 1968; Neher and Sakaba, 2008; Zucker, 1999). At P160, PPF was overall slightly increased in all NMJ types in SOD1 mice, although no single comparison between WT and SOD1 were significant. This result could be due to the poor binding and storage of intracellular calcium in ALS MN (for a review see (Irvin et al., 2015), associated with a decrease in  $\text{Ca}^{++}$ - binding protein like parvalbumin, that seem to be more striking in FF MN (Elliott and Snider, 1995). Moreover, parvalbumin acts as a slow calcium buffer after an action potential, governing some aspects of short-term plasticity like facilitation (Caillard et al., 2000; Muller et al., 2007). In our study, the effect was no longer present at P380 and P425. This shows that the specific mechanisms controlling PPF were only moderately altered at P160 and seem to recover as disease progressed.

In addition, the absence of variation in PPF in any of the MU type between WT and SOD1 mice despite the massive changes in synaptic strength was unexpected. PPF is indeed inversely correlated with the synaptic strength of a NMJ, which means that the stronger the synapse the least facilitation should be observed (Mallart and Martin, 1968). However, mutant NMJs do not follow this rule since the SOD1 FF MU systematically presented the lowest PPF ratio while S MU showed the highest PPF ratio. Nonetheless, this discrepancy is in accordance

with the pattern revealed in the MUSP, pointing to the fact that some intrinsic characteristics of the different MU govern PPF in WT and SOD1 mice.

#### *Implications of early changes in neurotransmission in SOD1<sup>G37R</sup> mice*

The implications of the early synaptic alterations may be at multiple levels. First, given the importance of Ach release at the NMJ to produce voluntary movements, reduced synaptic transmission in fast NMJs could eventually lead to motor deficits. Second, the specific function in itself of the FF MU may be impaired by this reduced output, since these MU are the last ones recruited for a physical task and are the fibers that will develop the maximum force (Kanning et al., 2010). Eventually, the FR MU show similar deficits at P425, which is likely to play an additional role in the weakness and loss of muscle force observed in affected individuals. Nonetheless, it is also possible that the reduction in *m* of the FF and FR MU does not play a fundamental role in the pathogenic process and does not impair severely motor function. Indeed, at the adult mammalian NMJ, three to five more neurotransmitters are released in the synaptic cleft than what is necessary to trigger an action potential in the muscle fiber, which allow to the NMJ transmission to remain effective under various conditions (Wood and Slater, 2001). However, *in vivo*, these alterations could lead to functional impairments by diminishing the probability of successful transmitter release in the EDL and also in the SOL, since the increase in neurotransmission could lead to a faster depletion of the readily-releasable synaptic vesicle pool, similar to fast NMJs with a high quantal content (Reid et al., 1999). Finally, the opposite synaptic changes in S and FF NMJs could trigger or reflect some adaptive responses to maintain a normal neurotransmission.

#### *Evidence for postsynaptic alterations of neurotransmission in the EDL*

The alteration in mEPP amplitude at P380, but only in the FF MU, could reflect presynaptic or postsynaptic alterations of neurotransmission. These possibilities include a presynaptic change in the synaptic vesicle content, or a postsynaptic change leading to an enhanced sensitivity to sodium and calcium entry or a change in the type/diameter of muscular fibres. Modified acetylcholine vesicle content is unlikely to be the cause of those changes,

since this is normally accompanied by a proportional change in EPP amplitude. No study has addressed this specific question in ALS. Conversely, an augmentation of cation sensitivity cannot fully explain our results since the morphological data show substantial fragmentation of the endplate and partial innervation, which would instead be consistent with a decrease in cation sensitivity. However, a change in the diameter of fiber types is a good possibility, given that mEPP amplitude is inversely correlated with fiber diameter (Sieck and Prakash, 1997) and atrophic fast fibers have already been observed in an ALS mouse model at a presymptomatic stage (Atkin et al., 2005). Indeed, difference in mEPP amplitude is present at P380 in FF NMJs, which is consistent with a gradual decrease of fiber diameter during disease progression.

In conclusion, this study provided an extensive characterisation of WT neurotransmission in the SOL and the EDL muscle, highlighting a specific gradient of synaptic properties between the S, FR and FF MU. By building a Profile of the MU synaptic properties (MUSP) based on the data of WT mice and using this as a reference to evaluate properties in a mouse model of ALS, we confirmed the presence of MU specific synaptic alterations in the disease, with an early imbalance in synaptic strength of the NMJs of various MU types. To the contrary, we showed that many parameters of the MUSP were unaltered in the mutant mice, included a relative preservation of spontaneous activity properties of the MU at all stages.

Further work is needed to understand the specific implications of the physiological changes reported here, since the precise long-term impact of those synaptic strength alterations on synaptic plasticity and neuromuscular function remain ill-defined. Moreover, as synaptic changes depend on the muscle type, evolve during disease progression and seem to be predictive of vulnerability to neurodegeneration, an electrophysiological test based on the specific neuromuscular properties of fast-twitch and slow-twitch muscles could eventually be developed to support earlier diagnosis of ALS, if the changes reported here are unique to ALS.

## Chapitre 3

### Discussion générale

#### 3.1 Discussion

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative énigmatique et complexe, touchant de multiples types cellulaires et influençant de nombreux systèmes au sein de l'individu affecté. Dans le cadre de la présente étude, nous avons porté notre attention sur les événements se produisant en périphérie, à la JNM, là où maintes altérations précoces ont été répertoriées. Plus spécialement, l'étude de la fonctionnalité de la JNM a été étudiée en effectuant des enregistrements de la transmission synaptique spontanée et évoquée chez les souris SOD1<sup>G37R</sup> et WT dans deux préparations neuromusculaires, le EDL et le SOL. À P160, l'examen attentif de la neurotransmission spontanée et évoquée chez les souris contrôles a révélé un gradient de propriétés synaptique en fonction du type d'unités motrices qui nous a permis de développer un Profil synaptique des unités motrices (PSUM), avec une fort potentiel prédictif sur la manière dont se comportent les UM entre elles. Nous avons mis en lumière plus facilement de nombreux changements synaptiques importants spécifiques aux JNMs dans

un modèle murin de SLA, apparaissant très tôt en période asymptomatique et progressant jusqu'à l'apparition de la maladie.

Ainsi, nous avons démontré la présence de changements opposés de l'activité évoquée chez les unités motrices lentes et rapide-fatigables des souris SOD1<sup>G37R</sup> à P160. Les UM S présentent une force synaptique augmentée en comparaison aux WT, alors que les UM présentaient un contenu quantique diminué, donnant lieu à un patron complètement inversé de la force des synapses (tiré du PSUM) en comparaison à leurs congénères WT. À P380, l'activité évoquée au sein des JNMs FF est demeurée plus faible que chez les contrôles, et était accompagnée d'anomalies morphologiques diverses. Toutefois, dans le SOL, à l'apparition des premiers symptômes de la maladie, l'augmentation du contenu quantique tend à disparaître chez les JNMs S alors qu'à l'inverse une diminution du contenu quantique chez les JNMs FR a été observée. Dans cette section, nous aborderons tout d'abord les mécanismes explicatifs possibles des altérations synaptiques mentionnées, de même que des hypothèses concernant les conséquences fonctionnelles de ces changements. De plus, diverses propositions concernant de potentielles avenues de recherche future seront intégrées au fil de la discussion.

### **3.1.1 Perturbations précoces opposées de l'activité évoquée chez les UM mutantes, en contradiction avec leurs propriétés intrinsèques respectives et le PSUM**

De manière générale, les MN innervant les UM lentes présentent un patron de décharge tonique à basse fréquence, généralement de 10 à 20 Hz (Hennig and Lomo, 1985), résistent à la fatigue et présentent une relâche de neurotransmetteurs réduite à chaque stimulation (Reid et al., 1999). Les MN innervant les UM rapides démontrent au contraire une activation phasique, avec des stimulations environ seulement 1% du temps chez le rat, qui sont toutefois envoyés à haute fréquence (en moyenne 80 Hz) (Hennig and Lomo, 1985). Les JNMs associées présentent par conséquent un contenu quantique augmenté, avec une résistance moindre à la fatigue (Reid et al., 1999). Le recrutement progressif des UM en fonction de leur taille, selon le principe de taille de Henneman (Henneman, 1985), est responsable du

développement de la force musculaire. Selon ce principe, les UM FF sont généralement recrutées en dernier du fait de leur grande taille.

L'étude des divers paramètres de la transmission synaptique chez les JNMs contrôles a permis de développer un profil, le PSUM, qui illustre les tendances relatives des propriétés synaptiques dans les UM FF, FR et S de la souris C57BL/6 WT (voir figure 2.5). Les quatre paramètres choisis, soit la fréquence et l'amplitude des événements spontanés et le contenu quantique et la facilitation paillée (PPF), étaient pour nous les plus représentatifs de la force synaptique d'une UM. Étant donné le comportement stéréotypé des UM les unes par rapport aux autres, le MUSP possède un puissant pouvoir prédictif sur la classification des UM simplement sur la base des caractéristiques synaptiques présentées. La transmission synaptique des WT est ainsi en accord avec les propriétés des MN et des UM précédemment mentionné, avec un gradient relatif de propriétés dans lesquels les JNMs FR présentent un phénotype intermédiaire, alors que les jonctions S et FF se situent aux deux extrémités de l'axe. Ce profil typique représente le moyen idéal de comparer les JNMs SOD1 contre les WT mais bien également de déterminer l'effet des altérations qui vont amener une inversion des propriétés intrinsèques relatives des UM et perturber le patron physiologique caractéristique du PSUM.

Le succès et l'importance du présent travail résident dans le fait d'avoir pour la première fois pu identifier et corréler les changements synaptiques observés avec le type d'unités motrices, révélant par le fait même d'importantes altérations perturbant les propriétés synaptiques habituelles des UM. Ainsi, la force relative des JNMs mutantes FF et S, telles que mesurées par le contenu quantique, ont donné lieu à un patron de force relative des UM pratiquement inversées dès la période asymptomatique (P160) (voir figure 10). Cela donne lieu à une totale discordance entre les propriétés de l'UM et leur relâche respective de neurotransmetteurs. Il s'avère donc que ces propriétés fondamentales de relâche sont perturbées dans le modèle SOD1<sup>G37R</sup>, entraînant par le fait même une complète perturbation du PSUM.

De nombreuses études se sont penchées sur l'excitabilité des MN dans la SLA, mais la présente étude a tenté de déterminer plus adéquatement l'output à la JNM des divers types de MN, variable d'importance dans la génération de la contraction musculaire. Dans notre

modèle, l'activité évoquée via le nerf tibial ou le nerf fibulaire profond directement à un seuil beaucoup plus élevé que le seuil de contraction permet de déterminer adéquatement la contribution et le fonctionnement direct de la transmission synaptique à la JNM, une fois un potentiel d'action généré. Dans ces conditions, il est clair que peu importe l'excitabilité relative des différents types de MN au départ, les JNMs FF relâchent en moyenne moins de neurotransmetteurs par stimulation alors que les JNMs S en relâchent plus en comparaison aux contrôles. Ainsi, peu importe la balance des inputs excitateurs et inhibiteurs qui s'exercent sur le MN, il s'avère que ceux-ci ne permettent pas de pallier parfaitement aux déficits de transmission qui ont cours en aval à la JNM, et ce dès la période asymptotique.

### **3.1.2 Mécanismes explicatifs des altérations de la transmission synaptique**

Les changements de la force synaptique mis en évidence dans ces travaux pourraient être causés par des altérations de nature diverse. Cependant, le fait d'observer des variations de la taille des PPM ainsi que du contenu quantique, en l'absence de changements proportionnels de la taille des potentiels de plaque motrices miniatures (PPMm), pointent vraisemblablement en faveur d'un changement présynaptique de la transmission. Ainsi, il apparaît dans nos données que c'est uniquement la quantité de neurotransmetteurs relâchée à chaque impulsion qui est soit augmentée ou soit diminuée. En ce qui a trait à la présence d'une amplitude de potentiel de plaque motrice et un contenu quantique diminué dès P160 au sein des UM FF, des explications probables émergent facilement en regard de la littérature existante. Ainsi, une immobilisation des vésicules a été rapportée chez la souris SOD1<sup>G93A</sup> spécifiquement dans les JNMs associés aux fibres rapides (FF), et ce bien avant l'apparition des premiers symptômes (Pun et al., 2006). Des anomalies du transport axonal ont également été mises en lumière (De Vos et al., 2007), spécialement celui de l'acétylcholine transférase ainsi qu'une relâche de neurotransmetteurs diminuée (Tateno et al., 2009). Une diminution de la probabilité de relâche lié à une réserve réduite des vésicules prêtes à être libérées rapidement (Naumenko et al., 2011) pourrait être également envisagée. Tous les facteurs énumérés précédemment sont à même de provoquer des déficits de la transmission, qui pourraient jouer un rôle dans les altérations du EDL à partir de P160 et P380, et également des UM FR du SOL à P425.



Ces altérations causant une baisse de la relâche d'acétylcholine ne peuvent toutefois fournir d'explications à la surprenante augmentation de contenu quantique observée chez les JNMs S du SOL dès P160, et qui perdurent jusqu'à P380 (Arbour et al., 2015). Au début de la maladie toutefois, cette différence disparaît. Encore une fois, l'absence de concomitant changement de l'amplitude des PPMm suggère une origine présynaptique au phénomène. Si une augmentation de la probabilité de relâche est en cause, elle n'est cependant pas jumelée à un changement dans la facilitation-pairée (PPF) auquel on devrait s'attendre (Mallart and Martin, 1968). Cette possibilité n'est cependant pas à exclure, puisqu'aucune étude ne s'est penchée sur le sujet en période présymptomatique dans la SLA.

De plus, il est bien connu que les récepteurs à l'adénosine  $A_{2A}$  et  $A_1$ , situés sur la partie présynaptique, peuvent exercer une certaine modulation de la transmission synaptique dans le SNC (Sebastiao and Ribeiro, 2009b) et de la plasticité synaptique à la JNM (Todd et al., 2010), encore que leur rôle en transmission évoquée basale soit sujet à controverse (Garcia et al., 2013). Néanmoins, une étude récente a mis en lumière un effet facilitateur augmenté des récepteurs  $A_{2A}$  sur la transmission évoquée dans le diaphragme de souris  $SOD1^{G93A}$  en comparaison aux contrôles (Nascimento et al., 2014). Ainsi, une même quantité d'adénosine provoquait une augmentation accrue de la taille des PPM, en comparaison aux JNMs contrôles, et cette facilitation était médiée par les récepteurs  $A_{2A}$ . Cet effet n'était observable qu'en période présymptomatique, puisque l'adénosine n'exerçait plus aucun effet en période symptomatique sur les JNMs mutantes. Il apparaît donc qu'une certaine altération de la fonction des récepteurs à l'adénosine  $A_{2A}$  est présente dès le début de la maladie et évolue significativement durant sa progression. Un débalancement de l'activation des récepteurs  $A_1$  et  $A_{2A}$  par l'adénosine pourrait donc influencer préférentiellement certains types de JNMs, dans le cas présent les plus lentes. En effet, le muscle étudié dans les travaux cités présentés sur l'adénosine est le diaphragme, qui ne contient que peu de fibres rapides IIX et IIB (Augusto et al., 2009), et il n'est donc pas exclu que cette altération de la fonction et de l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  ne touchent pas les JNMs FF.

De plus, il serait possible d'envisager à l'inverse qu'une altération de la fonction des récepteurs  $A_1$  puisse se produire dans les UM FF, puisque ces récepteurs jouent un rôle dans la dépression synaptique à la JNM (Todd et al., 2010) et leur activation peut provoquer une

baisse de la transmission spontanée basale (Garcia et al., 2013), qui rappelle celle observée dans la présente étude. Une récente étude a justement montré que des altérations touchaient également les interactions dans l'activation des récepteurs A1 et A<sub>2A</sub> dans la SLA, menant à une activité modulatrice perturbée entre les deux. Il serait intéressant de vérifier dans des études ultérieures le rôle de ces récepteurs dans le développement de la SLA et leur possible implication dans les altérations de force synaptique mentionnées précédemment.

### **3.1.3 Intégration des altérations de la transmission synaptique et des changements morphologiques**

Alors qu'il est plutôt complexe de déterminer si les changements observés au niveau des JNMs S sont bénéfiques ou non, il apparaît plutôt évident que les changements observés au sein des UM FF et FR ne semblent pas l'être, puisqu'ils sont en tous les cas prédictifs d'une altération prochaine de la morphologie de la JNM et de sa dénervation éventuelle. Les observations rapportées au sein du muscle à contraction lente EDL confirment donc la vulnérabilité particulière de ce type d'UM dans la pathologie. La présence extensive de dénervation et d'innervation partielle à P380, avant le début des premiers déficits moteurs, vient d'ailleurs appuyer ce fait, alors même que les JNMs du SOLEUS ne présentent que peu d'altérations à un stade plus avancé de la maladie, soit environ deux mois plus tard. Ces résultats confirment la relative vulnérabilité des muscles à contraction rapide tel que le muscle EDL ainsi que la résistance de muscles à contraction lente telle que le SOL précédemment mise en lumière dans divers modèles de SLA, notamment la souris SOD1<sup>G93A</sup> (Pun et al., 2006; Valdez et al., 2012).

De plus, il est frappant d'observer en parallèle les UM FR qui présentent tout à coup à P 425 elles aussi une transmission évoquée diminuée, et ce dans une frontière de temps bien délimitée après le début de la maladie, telle que caractérisée par la perte de poids. Ce changement qui n'était pas encore présent deux mois plus tôt dans le SOL, à P380 (Arbour et al., 2015), apparaît subitement et est particulièrement frappant : en effet, le contenu quantique est maintenant significativement réduit chez les JNMs FR SOD1 par rapport aux jonctions WT contrôles, et même par rapport aux JNMs S du SOL. C'est pratiquement l'inverse du portrait

présenté par les WT dans le PSUM. Contrairement aux WT, les JNMs rapides (FR) sont significativement plus faibles que les JNMs S chez les souris SOD1, ce qui va à l'encontre du profil attendu présenté par les souris contrôles sur la base du PSUM. Des études ont d'ailleurs démontré que les JNMs FR deviennent susceptibles à la dénervation après le début des symptômes de la maladie (Pun et al., 2006), et nous avons nous-même observé la présence de quelques JNMs partiellement innervées à ce stade dans le SOL (probablement de type FR). Il semble donc que dans les deux cas, autant pour les jonctions FF que FR, nous observons au sein de notre modèle la présence d'une transmission synaptique diminuée chez les souris mutantes précédant l'apparition d'altérations morphologiques importantes de la JNM, qui prédisent l'apparition prochaine de déficits moteurs et signalent une vulnérabilité potentielle.

#### **3.1.4 Conséquences fonctionnelles possibles des altérations de la neurotransmission des UM**

Quelles peuvent-être les conséquences de telles altérations du contenu quantique à long terme dans notre modèle d'étude de SLA? Tout d'abord, dans le cas d'une transmission réduite chez les UM rapides, il se pourrait que cette diminution de la libération de neurotransmetteurs cause parfois un abaissement critique du nombre de neurotransmetteurs sous le seuil du facteur de sécurité, compromettant par le fait même la fidélité synaptique. Des anomalies de la fidélité synaptique ont d'ailleurs été rapportés chez des modèles mutants TARDBP et FUS de poissons zébrés (Armstrong and Drapeau, 2013a, b). De plus, étant donné qu'il existe un gradient de recrutement des UM dans un ordre précis, selon leur taille, les FF sont recrutées en dernier de manière à développer une force maximale (Kanning et al., 2010). Il serait logique de penser qu'une augmentation du nombre de manques et une baisse d'efficacité synaptique pourrait par conséquent engendrer une perturbation dans la génération de la force musculaire. La diminution parallèle de contenu quantique dans les fibres FR au début de la période symptomatique (P425 dans la présente étude) pourrait exacerber encore plus ce phénomène. Une baisse d'efficacité et de fidélité synaptique progressive des UM joue certainement un rôle dans la faiblesse musculaire observée chez les personnes atteintes. Une résistance diminuée à la fatigue dans le muscle SOL des souris SOD1<sup>G93A</sup> symptomatiques

semblent d'ailleurs avoir une origine présynaptique, puisque les muscles stimulés directement démontrant par ailleurs une résistance accrue à la fatigue (Rizzuto et al., 2015).

De plus, la relâche continue d'une plus grande quantité de neurotransmetteurs par les jonctions lentes du SOL, activées normalement de manière tonique, pourrait avoir pour conséquence de réduire également la résistance à la fatigue, puisque la quantité de vésicules en réserve chute plus rapidement. Cela pourrait amener à son tour certaines lacunes dans le maintien de la posture ainsi que les mouvements à durée prolongée impliquant de la résistance. Cependant, le contenu quantique plus élevé ne persiste pas jusqu'au début de la maladie dans notre modèle d'étude, ce qui implique que les conséquences de cette hausse de la transmission en période présymptomatique semblent à première vue n'avoir que de minimes implications sur le fonctionnement moteur. Toutefois, sachant que des altérations de l'activité synaptique peuvent avoir de profondes conséquences sur les propriétés musculaires, une direction de recherche future intéressante serait de réaliser une étude plus approfondie du fonctionnement neuromusculaire des divers types de JNM. Cela serait probablement à même de révéler d'éventuels déficits synaptiques, notamment en utilisant des protocoles de stimulations prolongées et intenses qui mettront à l'épreuve les diverses UM et exacerberont les éventuelles altérations.

### **3.1.5 Conséquences possibles des changements sur les cellules gliales à la JNM**

Des avenues d'étude jusqu'ici plutôt négligées impliquent le rôle joué par les cellules gliales à la JNM, les cellules de Schwann périssynaptiques (CSPs), dans le contexte de la transmission synaptique déficiente à la JNM. Il est intéressant de se demander si des altérations de la neurotransmission exposées précédemment pourraient affecter les réponses calciques des cellules de Schwann. Par la suite, ces réponses pourraient altérer en retour des phénomènes de plasticité synaptique, et même la transmission basale. Les CSPs possèdent en effet des récepteurs purinergiques et muscariniques, et leur activation induit la libération de stock de calcium provenant des réserves internes (Jahromi et al., 1992; Rochon et al., 2001). De plus, les réponses calciques des CSPs gouvernent des phénomènes de potentialisation à court et long-terme, puisqu'elles libèrent des molécules appelées gliotransmetteurs,

notamment l'ATP, qui est dégradé en adénosine, permettant de potentialiser la neurotransmission en activant les récepteurs A<sub>2A</sub> présynaptiques ou de provoquer une dépression de la transmission synaptique en activant les récepteurs A<sub>1</sub> présynaptiques (Todd et al., 2010). De plus, les CSPs des différents types d'UM semblent posséder des propriétés gliales intrinsèques (Rousse et al., 2010), les réponses calciques étant plus élevées dans les muscles à contraction rapides que dans le muscle SOL, ce qui influence bien entendu l'ampleur des phénomènes de plasticité synaptique observés.

Une première étude publiée récemment au sein du laboratoire a montré que les réponses calciques des CSPs étaient augmentées jusqu'à P380 dans le SOL, cette hausse étant médiée par une activation accrue des récepteurs muscariniques sur les CSPs (Arbour et al., 2015). De plus, il semble que dans le muscle Sternomastoidien, un muscle à contraction rapide, les réponses calciques mesurées dans les CSPs sont réduites, en corrélation avec un contenu quantique diminué (données non publiées). Cependant, dans les deux cas une contribution accrue des récepteurs muscariniques a été observée. Quelle peut bien être l'implication de ces réponses calciques altérées? L'action des récepteurs muscariniques des CSPs permet le maintien et la stabilité de la JNM alors qu'une baisse de l'activation de ceux-ci jumelée à une activation des récepteurs purinergiques stimulent la réparation et le remodelage de la JNM, induisant l'expression de la protéine gliale d'acide fibrillaire (GFAP) (Georgiou et al., 1999). Nous prédisons donc que des perturbations à long terme des réponses calciques gliales telles qu'observées dans la SLA auront de profondes répercussions sur la plasticité synaptique enregistrée à la JNM, et pourrait nuire à leur rôle dans la réparation et la réinnervation de la JNM dans la SLA. L'étude de l'interaction des CSPs dans le cadre de la SLA représente ainsi une voie de recherche prometteuse étant donné leur rôle de modulation de la transmission synaptique à la JNM. Des travaux ultérieurs permettront de mettre en lumière de manière précoce des altérations de la plasticité synaptique et peut-être même des altérations de la capacité des cellules gliales à moduler la transmission synaptique à la JNM.

### 3.1.6 Analyse intégrée de l'activité du MN et des altérations des UM dans la SLA

Il est intéressant de mettre en parallèle les résultats obtenus avec les perturbations de l'excitabilité des MN des modèles animaux exposées dans la littérature. En effet, une claire hyperexcitabilité de neurones en culture a été observée en période embryonnaire et néonatale, notamment une augmentation de la fréquence de décharge des motoneurones en fonction de l'intensité du stimulus, accompagnée par la mise en évidence d'un courant sodique persistant (Kuo et al., 2004), et ce même dans les neurones corticaux (Pieri et al., 2003). Certaines de ces altérations touchaient seulement les MN ayant une résistance d'entrée plus faible, soit les plus larges (Kuo et al., 2005). Cependant, c'est plutôt un courant sodique persistant diminué qui est observé lorsque les neurones sont issues de la souris  $SOD1^{G93A}$  (faible copie) dans leur seconde semaine postnatale, avec un gain moindre cette fois lors d'injections de courants progressif (Pambo-Pambo et al., 2009). *In vivo* également, chez des souris adultes, les résultats sont contradictoires, puisqu'une hypoexcitabilité de certains MN a été mise en évidence dans une proportion spécifique de neurones moteurs de grande taille, les autres étant relativement préservés (Delestree et al., 2014).

Plusieurs études ont ainsi démontré que le patron de décharge du motoneurone contribue à déterminer les propriétés contractiles du muscle (Gorza et al., 1988; Westgaard and Lomo, 1988). Ainsi, il est fort probable que les changements d'excitabilité motoneuronale qui ont cours durant la maladie soient à même d'influencer le patron de décharge du motoneurone. Il serait plausible d'attribuer les modifications observées au sein des UM FF à un changement progressif des propriétés de la JNM vers un phénotype plus lent au sein des UM FF, alors que les UM S pourraient évoluer vers un phénotype plus rapide. De plus, dans le cas des UM FF, le fait de démontrer une activité évoquée diminuée et persistante de même qu'une amplitude augmentée des PPMm sont en accord avec une progression vers un changement des propriétés de la JNM vers un phénotype moins rapide et potentiellement du type de fibres, alors que les JNMs S du SOL deviennent de plus en plus fortes, mimant une transition vers un phénotype plus rapide.

Ainsi, en admettant que des variations de l'excitabilité motoneuronale aient une influence sur le patron de décharge des MN dans la SLA, des changements pré et postsynaptiques pourraient se produire, témoignant d'une transformation de la JNM vers un

phénotype plus lent ou plus rapide selon le cas. Dans le premier cas, il a été démontré qu'une stimulation via le nerf des fibres du EDL avec un patron d'activité tonique amène diverses conséquences dont une diminution de la taille des fibres et du contenu quantique, une résistance accrue à la fatigue et une diminution de la vitesse de contraction (Reid et al., 2003). Dans le second cas, une stimulation du SOL avec un patron d'activité phasique résulte en une diminution du contenu quantique, une diminution de la taille des fibres accompagnées d'une réduction de la taille de la réserve de vésicules, une baisse de la résistance à la fatigue ainsi qu'une parallèle réduction de la vitesse de contraction (Reid et al., 2003).

Ces changements pourraient-ils mimer les changements parallèles rapportés dans le Profil synaptique découlant de la présente expérience? Une étude rapporte justement une résistance augmentée à la fatigue ainsi qu'une baisse de la force de contraction en période symptomatique dans les fibres musculaires rapides du EDL chez la souris SOD1<sup>G93A</sup> (Derave et al., 2003). Cependant, bien qu'une atrophie certaine ait été observée dans la présente étude à P380 dans le muscle EDL, l'analyse immunohistochimique a révélé la persistance des UM FF à la surface du EDL, comme en témoigne une expression extensive des chaînes de myosine IIB (voir figure 2.2). La présence graduelle d'une plus grande proportion de fibres mixtes démontrant des propriétés mixtes n'est toutefois pas à exclure, puisque nous n'avons pas réalisé de coupes transversales répétées sur un même muscle afin de quantifier les proportions de fibres mixtes. Néanmoins, étant donné la conservation de propriétés précises spécifiques au type d'unités motrices telle que la fréquence de relâche spontanée des neurotransmetteurs et le ratio de facilitation, qui permettent facilement la classification du type de fibres selon le profil, il s'ensuit que les UM FF demeurent vraisemblablement présentes jusqu'à l'apparition de la maladie dans notre modèle SOD1<sup>G37R</sup>.

De plus, les altérations observées dans le SOL ne cadrent pas du tout avec l'hypothèse d'un changement de fréquence de décharge des motoneurones: nous avons en effet rapporté une augmentation impressionnante du contenu quantique et de la taille des EPP dans les JNMs S, ce qui est incompatible avec les prédictions mentionnées plus haut. D'autant plus que nous avons identifié le type de chaînes de myosine des JNMs dans toutes les expériences, ce qui implique que les transformations potentielles n'étaient de source sûre pas complète. Il nous apparaît donc très improbable qu'un changement de l'excitabilité ou du

patron d'activité du neurone, jumelé à une évolution de l'expression des MHC, soit la cause des changements opposés de la transmission évoquée démontrés précédemment.

### **3.1.7 Évidence d'une dysrégulation calcique au sein des MN et de la terminaison axonale**

Le calcium semble être un élément intégrateur des anomalies des MN et de la JNM, puisque de nombreux processus pathologiques répertoriés sont liés à un dérèglement du métabolisme ou des concentrations intracellulaires du calcium. La SLA semble ainsi être une pathologie impliquant de substantiels dérèglements du métabolisme calcique qui ont depuis des années été mises en évidence dans d'innombrables modèles d'étude de la SLA ainsi que chez des patients directement. Par exemple, un influx accru de calcium via des récepteurs AMPA plus permissifs au calcium maintiendrait une concentration cytosolique plus élevée que la normale au sein des MN. Ainsi, une hyperexcitabilité des neurones moteurs spinaux de même que des neurones moteurs corticaux spinaux a été impliquée dans des mécanismes d'excitotoxicité qui pourraient expliquer la mort neuronale et occasionner par conséquent des perturbations du calcium homéostasique au sein des motoneurones. S'ensuivraient ensuite d'importantes altérations touchant les mitochondries dans le MN dont l'accolement de protéines mutées mal repliées sur la surface des mitochondries (Vande Velde et al., 2008), une perturbation du processus de tamponnage du  $\text{Ca}^{++}$  par les mitochondries (Damiano et al., 2006; Tradewell et al., 2011) et une augmentation du calcium dans celles-ci jumelée à une déplétion concomitante du calcium dans le cytoplasme chez la souris  $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$  symptomatique (Siklos et al., 1998).

De plus, d'importantes modifications du mécanisme de contrôle du calcium intracellulaire sont apparentes dans la SLA, et ce dans divers modèles. Les MN les plus riches en protéines permettant de lier le  $\text{Ca}^{++}$  tels que la caldinbine, la calréticuline et la parvalbumine sont ainsi les plus résistants à la pathologie causée par la mutation  $\text{SOD1}$  (Bernard-Marissal et al., 2012). Les niveaux de calréticuline, une protéine servant au métabolisme du calcium intracellulaire, se retrouvent ainsi réduits de moitié très tôt dans les fibres musculaires des UM vulnérables chez la souris  $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ , et semblent déterminer le début de la dénervation, activant le stress du RE et la voie de signalisation mTOR (Bernard-



Marissal et al., 2015). Cependant, une étude a déjà démontré que l'augmentation du tamponnage du  $\text{Ca}^{++}$  mitochondrial ne ralentit pas la progression de la maladie et n'augmente pas la survie des souris SOD1 (Parone et al., 2013).

Il aurait été attendu que de telles altérations du métabolisme calcique engendrent de profondes conséquences sur les phénomènes rapportés dans la présente étude. Par exemple, la facilitation mesurée précédemment est un processus qui est considéré comme dépendant du calcium résiduel, suivant un premier potentiel d'action (Kamiya and Zucker, 1994; Zucker, 1999). Cette relation, qui se révèle plutôt complexe, semble gouverné dans le SNC par la présence de protéines liant le  $\text{Ca}^{++}$  tels que la parvalbumine (Caillard et al., 2000). Ces enregistrements au sein du MN sont toutefois basés sur des mesures du calcium et du niveau protéique cytosolique dans le soma, et ne reflètent pas nécessairement fidèlement ce que l'on peut observer à la JNM.

Dans le cadre de la présente étude, de légères altérations du métabolisme calcique semblent présentes au sein des diverses unités motrices, bien que subtiles. Ainsi, en période asymptomatique, un effet clair de la mutation a causé une augmentation parallèle de la facilitation paillée (PPF), et ce indépendamment du type de JNMs. Il apparaît donc que si ce phénomène est gouverné par la quantité de calcium résiduel, celui-ci est légèrement augmenté à P160, quoique de manière bien faible puisque c'est seulement l'addition de l'effet de la mutation sur tous les types d'UM qui contribuent à la force de la relation. Cette baisse pourrait être due à une diminution du tamponnage du calcium par des protéines régulatrices, qui affectent cependant de la même manière les diverses JNMs. Il est surprenant de n'avoir pas observé d'altérations plus substantielles de ce paramètre au sein des JNMs mutantes, prouvant que peu importe les altérations du métabolisme calcique qui ont cours dans la pathologie, le type d'UM exerce toujours une influence capitale et le gradient de propriétés est relativement préservé dans notre modèle animal. De plus, la différence de facilitation disparaît à P380 et P425, laissant à penser que diverses adaptations ont lieu dans les motoneurones et évoluent suivant la progression de la maladie. Il s'avère donc que malgré tout, les JNMs conservent une bonne partie de leurs propriétés intrinsèques même une fois soumises au stress que représente l'expression de la protéine SOD1 mutante. Cela prouve également que les mécanismes causant les changements de la transmission évoquée relatés précédemment sont très ciblés.

### **3.1.8 Présence de mécanismes compensateurs et maintien d'une homéostasie relative dans la SLA**

De plus, malgré le fait que de nombreux paramètres soient significativement altérés au sein des JNMs SOD1 versus les JNMs WT, tels que le contenu quantique et la taille des PPM, les JNMs des souris mutantes se comportent toutefois relativement normalement lorsqu'est effectuée une comparaison entre les différents types d'UM. Ainsi, que ce soit pour la fréquence et l'amplitude des mPPM ainsi que pour la facilitation, les jonctions SOD1 respectent les variations intrinsèques au type d'unités motrices qui se retrouvent chez la WT (patron caractéristique d'évolution progressive FF-FR-S). Il existe donc une dualité dans les altérations démontrées précédemment : d'une part l'activité évoquée se retrouve complètement altérée en regard de certains aspects, d'autre part les JNMs SOD1 présentent tout de même un patron conservé des altérations de l'activité spontanée ainsi que de la PPF qui concordent parfaitement à ce qui est attendu en fonction du type de MN innervant la JNM et du type de fibres musculaires. Cela permet donc d'affirmer qu'une partie des propriétés intrinsèques qui caractérisent les UM dans la présente étude sont tout de même préservées au sein de notre modèle tout au long de la progression de la pathologie, ce qui contribue probablement au maintien d'une activité motrice régulière similaire aux WT sur une si longue période.

Il nous apparaît possible que nous rapportions dans la présente étude des différences causées en partie par des mécanismes de régulation. Par exemple, certains des changements observés permettent peut-être de pallier à certains déficits. Ainsi, même si les types d'UM remplissent normalement des rôles complètement différents, il n'est pas exclu que des adaptations à la maladie leur permettent pour un temps de maintenir un fonctionnement physiologique adéquat. Les fibres S montrent une augmentation de la transmission évoquée compensant peut-être pour la relative perte d'efficacité des JNMs FF. En effet, malgré les importants changements rapportés au sein de la transmission synaptique très tôt dans notre modèle (P160), les déficits moteurs et symptômes visibles n'apparaissent que plusieurs mois plus tard (P500). Il s'ensuit donc que l'animal arrive à très bien performer malgré tous ces changements flagrants de la transmission synaptique, ce qui implique nécessairement que leurs

effets délétères, s'il y en a, ne compromettent pas la production de mouvements à court terme mais exercent peut-être leurs actions sur la physiologie à long terme.

Cette adaptation nécessite probablement de mettre en branle des systèmes de maintien de l'homéostasie. Par exemple, une récente revue approfondie de la littérature à ce propos a révélé qu'autant dans le domaine du stress oxydatif, du métabolisme du calcium et de la respiration des mitochondries, des altérations initiales dès la naissance font place à un maintien de l'équilibre en période présymptomatique chez la souris SOD1<sup>G93A</sup>, pour finalement empirer durant la phase des symptômes cliniques (Irvin et al., 2015). Ces mécanismes de régulations, s'ils ne fonctionnent pas adéquatement ou ne peuvent remplir leur rôle efficacement, pourraient rendre le neurone moteur de plus en plus vulnérable à l'excitotoxicité. Il se pourrait que des mécanismes permettant la survie à court terme présentent toutefois des effets négatifs à plus long terme, activant par exemple des cascades de signalisation cellulaire de stress et de mort cellulaire. En effet, il apparaît qu'une augmentation de l'excitabilité des MN spinaux soit en fait protectrice dans un modèle de SLA et ait pour fonction de compenser une hypoexcitabilité initiale (Saxena et al., 2013). Ainsi, cette dernière étude a fait la démonstration que des adaptations des interneurons cholinergiques, incluant une augmentation de la taille des boutons C dans le but d'accroître l'input muscarinique spécifiquement sur les MN rapides (FF), avait pour conséquence d'augmenter leur excitabilité. Il s'agit peut-être d'un moyen de pallier au manque d'efficacité de la synapse. Cela entraînerait l'activation des voies de signalisation neuroprotectrices via mTOR ainsi qu'une diminution de l'agrégation des protéines SOD1. En revanche, il apparaît que ce processus entraîne une stimulation prolongée du système de stress du réticulum endoplasmique (RE) (Saxena et al., 2013). Ainsi, une claire activation des voies de signalisation du stress dans le RE notamment la réponse de dépliement des protéines (UPR), est progressivement mise en lumière dans la souris SOD1<sup>G93A</sup> asymptomatique, dès P30 chez les MN vulnérables FF, et un peu plus tard dans la maladie dans les MN FR (Saxena et al., 2009). Il s'ensuit que des mécanismes ayant un effet bénéfique à court terme pour le MN peuvent peut-être causer d'autres aberrations qui pourraient éventuellement engendrer des problèmes supplémentaires, et l'exploration de ces interactions représentent certainement des avenues d'étude intéressantes.

## 3.2 Conclusion

En conclusion, le profil de force synaptique en fonction des unités motrices développée dans cette étude s'est révélé un outil plus qu'utile pour clarifier les résultats obtenus et mettre en lumière les différences de la transmission synaptique. L'évolution frappante de la neurotransmission à la JNM de la période asymptomatique jusqu'au début de la maladie, certains paramètres demeurant constants et d'autres évoluant dans des directions diverses, montrent bien à quel point la SLA représente une maladie énigmatique dans lesquels des mécanismes pathologiques causés par la présence de la mutation affectent différemment les divers types d'UM et s'entremêlent possiblement avec des mécanismes régulateurs et compensateurs. Nous proposons qu'une étude approfondie de l'évolution de la transmission synaptique, que ce soit au niveau spinal, périphérique ou musculaire, doive nécessairement prendre en considération les particularités associées aux divers types d'UM dans la pathologie et est primordiale pour avoir une vision globale et intégratrice de la pathologie. De multiples travaux ultérieurs seront nécessaires pour mettre en lumière les conséquences de ces altérations sur la plasticité synaptique mais également s'attarder au rôle que jouent les cellules gliales à la JNM dans la modulation de la transmission dans la SLA. Les impressionnants changements synaptiques pourraient même permettre le développement d'outils diagnostiques précoces. Nos travaux impliquent donc que l'effet de la mutation SOD1 s'exerce différemment sur la transmission synaptique en fonction du type de JNM et présente une évolution temporelle précise, dont la valeur prédictive en ce qui a trait à la progression de la pathologie pourrait éventuellement se révéler utile à des fins diagnostiques dans des études ultérieures. Ces travaux nous éclairent sur la nécessité de s'attarder aux spécificités propres aux divers types d'UM afin de raffiner notre compréhension globale de la SLA et des mécanismes impliqués à l'œuvre dans le développement de la pathologie.

## Bibliographie

Amendola, J., Gueritaud, J.P., Lamotte d'Incamps, B., Bories, C., Liabeuf, S., Allene, C., Pambo-Pambo, A., and Durand, J. (2007). Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Archives italiennes de biologie* 145, 311-323.

Andersen, P.M., Forsgren, L., Binzer, M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keranen, M.L., Bergmark, L., Saarinen, A., Haltia, T., Tarvainen, I., *et al.* (1996). Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain : a journal of neurology* 119 (Pt 4), 1153-1172.

Appel, S.H., Smith, R.G., Alexianu, M., Siklos, L., Engelhardt, J., Colom, L.V., and Stefani, E. (1995). Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neuroscience* 3, 368-374.

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728-739.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences* 22, 208-215.

Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J.P., and Robitaille, R. (2015). Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 688-706.

Armstrong, G.A., and Drapeau, P. (2013a). Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 1741-1752.

Armstrong, G.A., and Drapeau, P. (2013b). Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Human molecular genetics* 22, 4282-4292.

Atkin, J.D., Scott, R.L., West, J.M., Lopes, E., Quah, A.K., and Cheema, S.S. (2005). Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscular disorders : NMD* 15, 377-388.

Augusto, V., Padovani, C.R. and Campos, G.E.R. (2004). Skeletal muscle fibre types in C57BL6J mice. *Braz. J. morphol. Sci.* 21, 89-94.

Auld, D.S., and Robitaille, R. (2003). Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40, 389-400.

Balice-Gordon, R.J., Breedlove, S.M., Bernstein, S., and Lichtman, J.W. (1990). Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated: in vivo observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10, 2660-2671.

Balice-Gordon, R.J., and Lichtman, J.W. (1990). In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10, 894-908.

Banack, S.A., and Cox, P.A. (2003). Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 61, 387-389.

Beard, J.D., and Kamel, F. (2015). Military service, deployments, and exposures in relation to amyotrophic lateral sclerosis etiology and survival. *Epidemiologic reviews* 37, 55-70.

Beghi, E., Logroscino, G., Chio, A., Hardiman, O., Millul, A., Mitchell, D., Swingler, R., and Traynor, B.J. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: results of a population-based pilot case-control study. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 11, 289-292.

Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* 330, 585-591.

Bergemalm, D., Jonsson, P.A., Graffmo, K.S., Andersen, P.M., Brannstrom, T., Rehnmark, A., and Marklund, S.L. (2006). Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 4147-4154.

Bernard-Marissal, N., Moumen, A., Sunyach, C., Pellegrino, C., Dudley, K., Henderson, C.E., Raoul, C., and Pettmann, B. (2012). Reduced calreticulin levels link endoplasmic reticulum stress and Fas-triggered cell death in motoneurons vulnerable to ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 4901-4912.

Bernard-Marissal, N., Sunyach, C., Marissal, T., Raoul, C., and Pettmann, B. (2015). Calreticulin levels determine onset of early muscle denervation by fast motoneurons of ALS model mice. *Neurobiology of disease* 73, 130-136.

Boillee, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D.W. (2006a). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52, 39-59.

Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006b). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392.

Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.S., Guarnieri, M., Xu, Z.S., Wong, P.C., Brown, R.H., Jr., Price, D.L., Sisodia, S.S., and Cleveland, D.W. (1994). Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8292-8296.

Boumediene, F., Druet-Cabanac, M., Marin, B., Preux, P.M., Allee, P., and Couratier, P. (2011). Contribution of geolocalisation to neuroepidemiological studies: incidence of ALS and environmental factors in Limousin, France. *Journal of the neurological sciences* 309, 115-122.

Brooks, B.R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *Journal of the neurological sciences* 124 Suppl, 96-107.

Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L., and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron, D. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases 1, 293-299.

Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., *et al.* (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327-338.

Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851-1854.

Bunton-Stasyshyn, R.K., Saccon, R.A., Fratta, P., and Fisher, E.M. (2014). SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*.

Burrell, J.R., Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2011). Isolated bulbar phenotype of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 12, 283-289.

Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M.R., and Marty, A. (2000). Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13372-13377.

Caller, T.A., Chipman, J.W., Field, N.C., and Stommel, E.W. (2013). Spatial analysis of amyotrophic lateral sclerosis in Northern New England, USA, 1997-2009. *Muscle & nerve* 48, 235-241.

Caller, T.A., Field, N.C., Chipman, J.W., Shi, X., Harris, B.T., and Stommel, E.W. (2012). Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 13, 25-32.

Caramia, M.D., Palmieri, M.G., Desiato, M.T., Iani, C., Scalise, A., Telera, S., and Bernardi, G. (2000). Pharmacologic reversal of cortical hyperexcitability in patients with ALS. *Neurology* 54, 58-64.

Castonguay, A., and Robitaille, R. (2001). Differential regulation of transmitter release by presynaptic and glial Ca<sup>2+</sup> internal stores at the neuromuscular synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 1911-1922.

Chattopadhyay, M., and Valentine, J.S. (2009). Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. *Antioxidants & redox signaling* 11, 1603-1614.

Chio, A. (1999). ISIS Survey: an international study on the diagnostic process and its implications in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology* 246 Suppl 3, III1-5.

Chio, A., Calvo, A., Dossena, M., Ghiglione, P., Mutani, R., and Mora, G. (2009a). ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer-specific. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 10, 205-209.

Chio, A., Logroscino, G., Hardiman, O., Swingler, R., Mitchell, D., Beghi, E., Traynor, B.G., and Eurals, C. (2009b). Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 10, 310-323.

Chio, A., Traynor, B.J., Lombardo, F., Fimognari, M., Calvo, A., Ghiglione, P., Mutani, R., and Restagno, G. (2008a). Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Neurology* 70, 533-537.

Chio, A., Traynor, B.J., Swingler, R., Mitchell, D., Hardiman, O., Mora, G., Beghi, E., Logroscino, G., and consortium, E. (2008b). Amyotrophic lateral sclerosis and soccer: a different epidemiological approach strengthen the previous findings. *Journal of the neurological sciences* 269, 187-188; author reply 188-189.



- Clamann, H.P., and Robinson, A.J. (1985). A comparison of electromyographic and mechanical fatigue properties in motor units of the cat hindlimb. *Brain research* 327, 203-219.
- Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., *et al.* (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113-117.
- Couratier, P., Marin, B., Lautrette, G., Nicol, M., and Preux, P.M. (2014). [Epidemiology, clinical spectrum of ALS and differential diagnoses]. *Presse medicale* 43, 538-548.
- Couteaux, R., and Pecot-Dechavassine, M. (1970). [Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences Serie D: Sciences naturelles* 271, 2346-2349.
- Cox, P.A., and Sacks, O.W. (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58, 956-959.
- Crawley, M.J. (2007). *The R book* (Chichester, England ; Hoboken, N.J.: Wiley).
- Cronin, S., Hardiman, O., and Traynor, B.J. (2007). Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 68, 1002-1007.
- Cudkowicz, M.E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D.L., Schoenfeld, D.A., Hosler, B.A., Horvitz, H.R., and Brown, R.H. (1997). Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 41, 210-221.
- Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica* 93, 537-550.
- Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., and Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *Journal of neurochemistry* 96, 1349-1361.
- Darabid, H., Arbour, D., and Robitaille, R. (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 1297-1313.
- de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitumoto, H., Nodera, H., Shefner, J., *et al.* (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 119, 497-503.

De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.F., Brownlee, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., *et al.* (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human molecular genetics* 16, 2720-2728.

De Winter, F., Vo, T., Stam, F.J., Wisman, L.A., Bar, P.R., Niclou, S.P., van Muiswinkel, F.L., and Verhaagen, J. (2006). The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Molecular and cellular neurosciences* 32, 102-117.

DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M.V., Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., *et al.* (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85, 501-512.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., *et al.* (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245-256.

Del Castillo, J., and Katz, B. (1954a). The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *The Journal of physiology* 124, 553-559.

Del Castillo, J., and Katz, B. (1954b). Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of physiology* 124, 560-573.

Delestree, N., Manuel, M., Iglesias, C., Elbasiouny, S.M., Heckman, C.J., and Zytnicki, D. (2014). Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of physiology* 592, 1687-1703.

Deng, H.X., Chen, W., Hong, S.T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., *et al.* (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211-215.

Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., *et al.* (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047-1051.

Derave, W., Van Den Bosch, L., Lemmens, G., Eijnde, B.O., Robberecht, W., and Hespel, P. (2003). Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiology of disease* 13, 264-272.

Dupuis, L., and Loeffler, J.P. (2009). Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Current opinion in pharmacology* 9, 341-346.

Eisen, A., Kim, S., and Pant, B. (1992). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle & nerve* 15, 219-224.

Elliott, J.L., and Snider, W.D. (1995). Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons. *Neuroreport* 6, 449-452.

Engelhardt, J.I., Siklos, L., Komuves, L., Smith, R.G., and Appel, S.H. (1995). Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* 20, 185-199.

Fagerlund, M.J., and Eriksson, L.I. (2009). Current concepts in neuromuscular transmission. *British journal of anaesthesia* 103, 108-114.

Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology* 185, 232-240.

Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., and Caroni, P. (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 2534-2542.

Fridovich, I. (1986a). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of biochemistry and biophysics* 247, 1-11.

Fridovich, I. (1986b). Superoxide dismutases. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 58, 61-97.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry* 64, 97-112.

Furukawa, Y., and O'Halloran, T.V. (2005). Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation. *The Journal of biological chemistry* 280, 17266-17274.

Garcia, N., Priego, M., Obis, T., Santafe, M.M., Tomas, M., Besalduch, N., Lanuza, M.A., and Tomas, J. (2013). Adenosine A(1) and A(2)A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction. *The European journal of neuroscience* 38, 2229-2241.

Georgiou, J., and Charlton, M.P. (1999). Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia* 27, 101-109.

Georgiou, J., Robitaille, R., and Charlton, M.P. (1999). Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 3836-3846.

Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W.S., and Charlton, M.P. (1994). Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12, 443-455.

Glass, D.J., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., DiStefano, P.S., Valenzuela, D.M., and Yancopoulos, G.D. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 61, 435-444.

Goetz, C.G. (2000). Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle & nerve* 23, 336-343.

Gorza, L. (1990). Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 38, 257-265.

Gorza, L., Gundersen, K., Lomo, T., Schiaffino, S., and Westgaard, R.H. (1988). Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high-frequency stimulation in the rat. *The Journal of physiology* 402, 627-649.

Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E., and Oppenheim, R.W. (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 8774-8786.

Gouspillou, G., Sgarioto, N., Norris, B., Barbat-Artigas, S., Aubertin-Leheudre, M., Morais, J.A., Burelle, Y., Taivassalo, T., and Hepple, R.T. (2014). The relationship between muscle fiber type-specific PGC-1alpha content and mitochondrial content varies between rodent models and humans. *PLoS One* 9, e103044.

Grad, L.I., and Cashman, N.R. (2014). Prion-like activity of Cu/Zn superoxide dismutase: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Prion* 8, 33-41.

Grad, L.I., Fernando, S.M., and Cashman, N.R. (2015). From molecule to molecule and cell to cell: prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* 77, 257-265.

Grad, L.I., Pokrishevsky, E., Silverman, J.M., and Cashman, N.R. (2014). Exosome-dependent and independent mechanisms are involved in prion-like transmission of propagated Cu/Zn superoxide dismutase misfolding. *Prion* 8, 331-335.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.

Hamidou, B., Couratier, P., Besancon, C., Nicol, M., Preux, P.M., and Marin, B. (2014). Epidemiological evidence that physical activity is not a risk factor for ALS. *European journal of epidemiology* 29, 459-475.

Hardiman, O., van den Berg, L.H., and Kiernan, M.C. (2011). Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neurology* 7, 639-649.

Hegedus, J., Putman, C.T., and Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* 28, 154-164.

Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of physiology* 586, 3337-3351.

Henneman, E. (1985). The size-principle: a deterministic output emerges from a set of probabilistic connections. *The Journal of experimental biology* 115, 105-112.

Hennig, R., and Lomo, T. (1985). Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 314, 164-166.

Hennig, R., and Lomo, T. (1987). Gradation of force output in normal fast and slow muscles of the rat. *Acta physiologica Scandinavica* 130, 133-142.

Horner, R.D., Grambow, S.C., Coffman, C.J., Lindquist, J.H., Oddone, E.Z., Allen, K.D., and Kasarskis, E.J. (2008). Amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans: evidence for a time-limited outbreak. *Neuroepidemiology* 31, 28-32.

Hunter, D.D., Shah, V., Merlie, J.P., and Sanes, J.R. (1989). A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature* 338, 229-234.

Iglesias, C., Sangari, S., El Mendili, M.M., Benali, H., Marchand-Pauvert, V., and Pradat, P.F. (2015). Electrophysiological and spinal imaging evidences for sensory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ open* 5, e007659.

Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of cell biology* 187, 761-772.

Irvin, C.W., Kim, R.B., and Mitchell, C.S. (2015). Seeking homeostasis: temporal trends in respiration, oxidation, and calcium in SOD1 G93A Amyotrophic Lateral Sclerosis mice. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 248.

Jahromi, B.S., Robitaille, R., and Charlton, M.P. (1992). Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron* 8, 1069-1077.

Jaiswal, M.K. (2014). Selective vulnerability of motoneuron and perturbed mitochondrial calcium homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: implications for motoneurons specific calcium dysregulation. *Molecular and cellular therapies* 2, 26.

Jaiswal, M.K., and Keller, B.U. (2009). Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca<sup>2+</sup> homeostasis in SOD1G93A mice. *Molecular pharmacology* 75, 478-489.

Johnson, F.O., and Atchison, W.D. (2009). The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology* 30, 761-765.

Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., *et al.* (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68, 857-864.

Jonsson, P.A., Ernhill, K., Andersen, P.M., Bergemalm, D., Brannstrom, T., Gredal, O., Nilsson, P., and Marklund, S.L. (2004). Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 127, 73-88.

Jonsson, P.A., Graffmo, K.S., Brannstrom, T., Nilsson, P., Andersen, P.M., and Marklund, S.L. (2006). Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65, 1126-1136.

Joyce, N.C., and Carter, G.T. (2013). Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* 5, S89-95.

Juntas-Morales, R., Pageot, N., Corcia, P., and Camu, W. (2014). Environmental factors in ALS. *Presse medicale* 43, 549-554.

Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., *et al.* (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics* 40, 572-574.

Kamel, F., Umbach, D.M., Hu, H., Munsat, T.L., Shefner, J.M., Taylor, J.A., and Sandler, D.P. (2005). Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative diseases* 2, 195-201.

Kamel, F., Umbach, D.M., Munsat, T.L., Shefner, J.M., Hu, H., and Sandler, D.P. (2002). Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology* 13, 311-319.

Kamel, F., Umbach, D.M., Munsat, T.L., Shefner, J.M., and Sandler, D.P. (1999). Association of cigarette smoking with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* 18, 194-202.

Kamiya, H., and Zucker, R.S. (1994). Residual Ca<sup>2+</sup> and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371, 603-606.

Kang, H., Cha, E.S., Choi, G.J., and Lee, W.J. (2014). Amyotrophic lateral sclerosis and agricultural environments: a systematic review. *Journal of Korean medical science* 29, 1610-1617.

Kang, S.H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D.W., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature neuroscience* 16, 571-579.

Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annual review of neuroscience* 33, 409-440.

Katz, B. (1971). Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 173, 123-126.

Katz, B., and Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of physiology* 195, 481-492.

Kent-Braun, J.A., Walker, C.H., Weiner, M.W., and Miller, R.G. (1998). Functional significance of upper and lower motor neuron impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* 21, 762-768.

Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377, 942-955.

Kim, N., Stiegler, A.L., Cameron, T.O., Hallock, P.T., Gomez, A.M., Huang, J.H., Hubbard, S.R., Dustin, M.L., and Burden, S.J. (2008). Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135, 334-342.

Krivickas, L.S. (2003). Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* 14, 327-345.

Kuffler, S.W., and Yoshikami, D. (1975). The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *The Journal of physiology* 251, 465-482.

Kumar, D.R., Aslinia, F., Yale, S.H., and Mazza, J.J. (2011). Jean-Martin Charcot: the father of neurology. *Clinical medicine & research* 9, 46-49.

Kuo, J.J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A.N., Fu, R., Bar, P.R., Anelli, R., Heckman, C.J., and Kroese, A.B. (2004). Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *Journal of neurophysiology* 91, 571-575.

Kuo, J.J., Siddique, T., Fu, R., and Heckman, C.J. (2005). Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *The Journal of physiology* 563, 843-854.

Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., *et al.* (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205-1208.

Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Guillet, P., and Meininger, V. (1996). Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347, 1425-1431.

Liscic, R.M., Grinberg, L.T., Zidar, J., Gitcho, M.A., and Cairns, N.J. (2008). ALS and FTLT: two faces of TDP-43 proteinopathy. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 15, 772-780.

Littleton, J.T., Chapman, E.R., Kreber, R., Garment, M.B., Carlson, S.D., and Ganetzky, B. (1998). Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. *Neuron* 21, 401-413.

Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Couratier, P., Mitchell, J.D., Swingler, R.J., Beghi, E., and Eurals (2008). Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79, 6-11.

Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., and Eurals (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81, 385-390.

Lomo, T., Westgaard, R.H., and Dahl, H.A. (1974). Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 187, 99-103.

Love, F.M., and Thompson, W.J. (1998). Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 9376-9385.

Machamer, J.B., Collins, S.E., and Lloyd, T.E. (2014). The ALS gene FUS regulates synaptic transmission at the Drosophila neuromuscular junction. *Human molecular genetics* 23, 3810-3822.

Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G., Waite, A., Rollinson, S., Chio, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., *et al.* (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology* 11, 323-330.



- Malek, A.M., Barchowsky, A., Bowser, R., Youk, A., and Talbott, E.O. (2012). Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis of epidemiological studies: pesticide exposure as a risk factor for ALS. *Environmental research* 117, 112-119.
- Mallart, A., and Martin, A.R. (1968). The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of physiology* 196, 593-604.
- Mantilla, C.B., and Sieck, G.C. (2013). Neuromotor control in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of applied physiology* 114, 1246-1252.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., *et al.* (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223-226.
- Maselli, R.A., Wollman, R.L., Leung, C., Distad, B., Palombi, S., Richman, D.P., Salazar-Grueso, E.F., and Roos, R.P. (1993). Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* 16, 1193-1203.
- McGuire, V., Longstreth, W.T., Jr., Nelson, L.M., Koepsell, T.D., Checkoway, H., Morgan, M.S., and van Belle, G. (1997). Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study. *American journal of epidemiology* 145, 1076-1088.
- Meehan, C.F., Moldovan, M., Marklund, S.L., Graffmo, K.S., Nielsen, J.B., and Hultborn, H. (2010). Intrinsic properties of lumbar motor neurones in the adult G127insTGGG superoxide dismutase-1 mutant mouse in vivo: evidence for increased persistent inward currents. *Acta physiologica* 200, 361-376.
- Menon, P., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2015). Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 126, 803-809.
- Miranda, M.L., Alicia Overstreet Galeano, M., Tassone, E., Allen, K.D., and Horner, R.D. (2008). Spatial analysis of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans. *Neurotoxicology* 29, 964-970.
- Mittaud, P., Camilleri, A.A., Willmann, R., Erb-Vogtli, S., Burden, S.J., and Fuhrer, C. (2004). A single pulse of agrin triggers a pathway that acts to cluster acetylcholine receptors. *Molecular and cellular biology* 24, 7841-7854.
- Moloney, E.B., de Winter, F., and Verhaagen, J. (2014). ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Frontiers in neuroscience* 8, 252.

- Mrowczynski, W., Celichowski, J., Raikova, R., and Krutki, P. (2015). Physiological consequences of doublet discharges on motoneuronal firing and motor unit force. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 81.
- Mulder, D.W., and Kurland, L.T. (1987). Motor neuron disease: epidemiologic studies. *Advances in experimental medicine and biology* 209, 325-332.
- Muller, M., Felmy, F., Schwaller, B., and Schneggenburger, R. (2007). Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca<sup>2+</sup> buffer in the calyx of Held that accelerates the decay of Ca<sup>2+</sup> and short-term facilitation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 2261-2271.
- Murray, M.E., DeJesus-Hernandez, M., Rutherford, N.J., Baker, M., Duara, R., Graff-Radford, N.R., Wszolek, Z.K., Ferman, T.J., Josephs, K.A., Boylan, K.B., *et al.* (2011). Clinical and neuropathologic heterogeneity of c9FTD/ALS associated with hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *Acta neuropathologica* 122, 673-690.
- Nagano, S., Ogawa, Y., Yanagihara, T., and Sakoda, S. (1999). Benefit of a combined treatment with trientine and ascorbate in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice. *Neuroscience letters* 265, 159-162.
- Narai, H., Manabe, Y., Nagai, M., Nagano, I., Ohta, Y., Murakami, T., Takehisa, Y., Kamiya, T., and Abe, K. (2009). Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation. *Neurology international* 1, e16.
- Nascimento, F., Pousinha, P.A., Correia, A.M., Gomes, R., Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2014). Adenosine A2A receptors activation facilitates neuromuscular transmission in the pre-symptomatic phase of the SOD1(G93A) ALS mice, but not in the symptomatic phase. *PLoS one* 9, e104081.
- Naumenko, N., Pollari, E., Kurronen, A., Giniatullina, R., Shakirzyanova, A., Magga, J., Koistinaho, J., and Giniatullin, R. (2011). Gender-Specific Mechanism of Synaptic Impairment and Its Prevention by GCSF in a Mouse Model of ALS. *Frontiers in cellular neuroscience* 5, 26.
- Neher, E., and Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59, 861-872.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., *et al.* (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130-133.
- Nishimune, H. (2012). Active zones of mammalian neuromuscular junctions: formation, density, and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1274, 24-32.

Nishimune, H., Sanes, J.R., and Carlson, S.S. (2004). A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432, 580-587.

Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R., Gillingwater, T., Webb, J., *et al.* (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of human genetics* 75, 822-831.

Noakes, P.G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1995). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature* 374, 258-262.

Okado-Matsumoto, A., Myint, T., Fujii, J., and Taniguchi, N. (2000). Gain in functions of mutant Cu,Zn-superoxide dismutases as a causative factor in familial amyotrophic lateral sclerosis: less reactive oxidant formation but high spontaneous aggregation and precipitation. *Free radical research* 33, 65-73.

Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A., and Mash, D.C. (2009). Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica* 120, 216-225.

Pambo-Pambo, A., Durand, J., and Gueritaud, J.P. (2009). Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *Journal of neurophysiology* 102, 3627-3642.

Pardo, C.A., Xu, Z., Borchelt, D.R., Price, D.L., Sisodia, S.S., and Cleveland, D.W. (1995). Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 954-958.

Parone, P.A., Da Cruz, S., Han, J.S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A.P., Lee, S.K., Tseng, E., and Cleveland, D.W. (2013). Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 4657-4671.

Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C.P., Longone, P., Cavalcanti, S., and Zona, C. (2003). Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters* 351, 153-156.

Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N.B., and Zona, C. (2009). Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology* 215, 368-379.

Pinard, A., Levesque, S., Vallee, J., and Robitaille, R. (2003). Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse. *The European journal of neuroscience* 18, 3241-3250.

Poage, R.E., and Meriney, S.D. (2002). Presynaptic calcium influx, neurotransmitter release, and neuromuscular disease. *Physiology & behavior* 77, 507-512.

Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2011). The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell* 147, 498-508.

Prakash, Y.S., Miller, S.M., Huang, M., and Sieck, G.C. (1996). Morphology of diaphragm neuromuscular junctions on different fibre types. *Journal of neurocytology* 25, 88-100.

Prakash, Y.S., Smithson, K.G., and Sieck, G.C. (1995). Growth-related alterations in motor endplates of type-identified diaphragm muscle fibres. *Journal of neurocytology* 24, 225-235.

Prudencio, M., Hart, P.J., Borchelt, D.R., and Andersen, P.M. (2009). Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: correlation to human disease. *Human molecular genetics* 18, 3217-3226.

Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nature neuroscience* 9, 408-419.

Pupillo, E., Messina, P., Giussani, G., Logroscino, G., Zoccolella, S., Chio, A., Calvo, A., Corbo, M., Lunetta, C., Marin, B., *et al.* (2014). Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a European population-based case-control study. *Annals of neurology* 75, 708-716.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.-S., and White, L.E. *Neuroscience, Fourth Edition*, Sunderland, MA : Sinauer Associates, Inc. , 2011. 759p.

Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., *et al.* (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature genetics* 13, 43-47.

Reddi, A.R., and Culotta, V.C. (2013). SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* 152, 224-235.

Regan, R.F., Panter, S.S., Witz, A., Tilly, J.L., and Giffard, R.G. (1995). Ultrastructure of excitotoxic neuronal death in murine cortical culture. *Brain research* 705, 188-198.

Reid, B., Martinov, V.N., Nja, A., Lomo, T., and Bewick, G.S. (2003). Activity-dependent plasticity of transmitter release from nerve terminals in rat fast and slow muscles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 9340-9348.

Reid, B., Slater, C.R., and Bewick, G.S. (1999). Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 2511-2521.

Reist, N.E., and Smith, S.J. (1992). Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7625-7629.

Renton, A.E., Chio, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience* 17, 17-23.

Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., *et al.* (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257-268.

Ritter, L.K., Tresch, M.C., Heckman, C.J., Manuel, M., and Tysseling, V.M. (2014). Characterization of motor units in behaving adult mice shows a wide primary range. *Journal of neurophysiology* 112, 543-551.

Rizzuto, E., Pisu, S., Musaro, A., and Del Prete, Z. (2015). Measuring Neuromuscular Junction Functionality in the SOD1(G93A) Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of biomedical engineering* 43, 2196-2206.

Robitaille, R. (1995). Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 7121-7131.

Robitaille, R. (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21, 847-855.

Robitaille, R., Adler, E.M., and Charlton, M.P. (1990). Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5, 773-779.

Robitaille, R., Adler, E.M., and Charlton, M.P. (1993a). Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *Journal of physiology, Paris* 87, 15-24.

Robitaille, R., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., and Charlton, M.P. (1993b). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11, 645-655.

Rocha, M.C., Pousinha, P.A., Correia, A.M., Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2013). Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PloS one* 8, e73846.

Rochon, D., Rouse, I., and Robitaille, R. (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 3819-3829.

Rosato Siri, M.D., and Uchitel, O.D. (1999). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *The Journal of physiology* 514 ( Pt 2), 533-540.

Rosen, D.R. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364, 362.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., *et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.

Rouse, I., St-Amour, A., Darabid, H., and Robitaille, R. (2010). Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience* 167, 621-632.

Rowland, L.P., and Shneider, N.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine* 344, 1688-1700.

Saito, A., and Zacks, S.I. (1969). Ultrastructure of Schwann and perineural sheaths at the mouse neuromuscular junction. *The Anatomical record* 164, 379-390.

Sakowski, S.A., Lunn, J.S., Busta, A.S., Oh, S.S., Zamora-Berridi, G., Palmer, M., Rosenberg, A.A., Philip, S.G., Dowling, J.J., and Feldman, E.L. (2012). Neuromuscular effects of G93A-SOD1 expression in zebrafish. *Molecular neurodegeneration* 7, 44.

Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature neuroscience* 12, 627-636.

Saxena, S., Roselli, F., Singh, K., Leptien, K., Julien, J.P., Gros-Louis, F., and Caroni, P. (2013). Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron* 80, 80-96.

Schaefer, A.M., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of comparative neurology* 490, 209-219.

Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2009a). Adenosine receptors and the central nervous system. *Handbook of experimental pharmacology*, 471-534.

Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2009b). Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. *Current neuropharmacology* 7, 180-194.

Sieck, G.C., and Fournier, M. (1990). Changes in diaphragm motor unit EMG during fatigue. *Journal of applied physiology* 68, 1917-1926.

Sieck, G.C., and Prakash, Y.S. (1997). Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 22, 197-230.

Sieck, G.C., Zhan, W.Z., Prakash, Y.S., Daoood, M.J., and Watchko, J.F. (1995). SDH and actomyosin ATPase activities of different fiber types in rat diaphragm muscle. *Journal of applied physiology* 79, 1629-1639.

Siklos, L., Engelhardt, J.I., Alexianu, M.E., Gurney, M.E., Siddique, T., and Appel, S.H. (1998). Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57, 571-587.

Son, Y.J., Trachtenberg, J.T., and Thompson, W.J. (1996). Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends in neurosciences* 19, 280-285.

Souayah, N., Coakley, K.M., Chen, R., Ende, N., and McArdle, J.J. (2012). Defective neuromuscular transmission in the SOD1 G93A transgenic mouse improves after administration of human umbilical cord blood cells. *Stem cell reviews* 8, 224-228.

Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A., and Roy, D.N. (1986). Motorneurone disease on Guam: possible role of a food neurotoxin. *Lancet* 1, 965.

Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., *et al.* (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668-1672.

Stathopoulos, P.B., Rumfeldt, J.A., Scholz, G.A., Irani, R.A., Frey, H.E., Hallewell, R.A., Lepock, J.R., and Meiering, E.M. (2003). Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7021-7026.

Stieber, A., Gonatas, J.O., and Gonatas, N.K. (2000). Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *Journal of the neurological sciences* 173, 53-62.

Subramaniam, J.R., Lyons, W.E., Liu, J., Bartnikas, T.B., Rothstein, J., Price, D.L., Cleveland, D.W., Gitlin, J.D., and Wong, P.C. (2002). Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nature neuroscience* 5, 301-307.

Tateno, M., Kato, S., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., and Araki, T. (2009). Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Human molecular genetics* 18, 942-955.

Todd, K.J., Auld, D.S., and Robitaille, R. (2007). Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *The European journal of neuroscience* 25, 1287-1296.

Todd, K.J., Darabid, H., and Robitaille, R. (2010). Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 11870-11882.

Todd, K.J., and Robitaille, R. (2006). Neuron-glia interactions at the neuromuscular synapse. *Novartis Foundation symposium* 276, 222-229; discussion 229-237, 275-281.

Tortelli, R., Conforti, F.L., Cortese, R., D'Errico, E., Distaso, E., Mazzei, R., Ungaro, C., Magariello, A., Gambardella, A., Logroscino, G., *et al.* (2013). Amyotrophic lateral sclerosis: a new missense mutation in the SOD1 gene. *Neurobiology of aging* 34, 1709 e1703-1705.

Tradewell, M.L., Cooper, L.A., Minotti, S., and Durham, H.D. (2011). Calcium dysregulation, mitochondrial pathology and protein aggregation in a culture model of amyotrophic lateral sclerosis: mechanistic relationship and differential sensitivity to intervention. *Neurobiology of disease* 42, 265-275.

Urbano, F.J., Piedras-Renteria, E.S., Jun, K., Shin, H.S., Uchitel, O.D., and Tsien, R.W. (2003). Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3491-3496.

Vaccaro, A., Patten, S.A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., Drapeau, P., Kabashi, E., and Parker, J.A. (2012). Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *PloS one* 7, e42117.

Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Fox, M.A., and Sanes, J.R. (2012). Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PloS one* 7, e34640.

van Zundert, B., Peuscher, M.H., Hynynen, M., Chen, A., Neve, R.L., Brown, R.H., Jr., Constantine-Paton, M., and Bellingham, M.C. (2008). Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 10864-10874.

Vande Velde, C., Miller, T.M., Cashman, N.R., and Cleveland, D.W. (2008). Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4022-4027.

Vassall, K.A., Stubbs, H.R., Primmer, H.A., Tong, M.S., Sullivan, S.M., Sobering, R., Srinivasan, S., Briere, L.A., Dunn, S.D., Colon, W., *et al.* (2011). Decreased stability and increased formation of soluble aggregates by immature superoxide dismutase do not account



for disease severity in ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2210-2215.

Venkova, K., Christov, A., Kamaluddin, Z., Kobalka, P., Siddiqui, S., and Hensley, K. (2014). Semaphorin 3A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 73, 702-713.

Vucic, S., Cheah, B.C., Yiannikas, C., and Kiernan, M.C. (2011). Cortical excitability distinguishes ALS from mimic disorders. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 122, 1860-1866.

Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2006). Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 117, 1458-1466.

Weisskopf, M.G., and Ascherio, A. (2009). Cigarettes and amyotrophic lateral sclerosis: only smoke or also fire? *Annals of neurology* 65, 361-362.

Weisskopf, M.G., Morozova, N., O'Reilly, E.J., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., and Ascherio, A. (2009). Prospective study of chemical exposures and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80, 558-561.

Westgaard, R.H., and Lomo, T. (1988). Control of contractile properties within adaptive ranges by patterns of impulse activity in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8, 4415-4426.

Wiedau-Pazos, M., Goto, J.J., Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Roe, J.A., Lee, M.K., Valentine, J.S., and Bredesen, D.E. (1996). Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 271, 515-518.

Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F., and Schon, E.A. (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of neurochemistry* 80, 616-625.

Williamson, T.L., and Cleveland, D.W. (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature neuroscience* 2, 50-56.

Wolfson, C., Kilborn, S., Oskoui, M., and Genge, A. (2009). Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Canada: a systematic review of the literature. *Neuroepidemiology* 33, 79-88.

Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked

SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* *14*, 1105-1116.

Wood, S.J., and Slater, C.R. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in neurobiology* *64*, 393-429.

Wu, H., Xiong, W.C., and Mei, L. (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* *137*, 1017-1033.

Xu, G., Ayers, J.I., Roberts, B.L., Brown, H., Fromholt, S., Green, C., and Borchelt, D.R. (2015). Direct and indirect mechanisms for wild-type SOD1 to enhance the toxicity of mutant SOD1 in bigenic transgenic mice. *Human molecular genetics* *24*, 1019-1035.

Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W., and Goldstein, L.S. (2008a). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 7594-7599.

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. (2008b). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature neuroscience* *11*, 251-253.

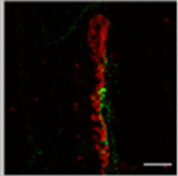
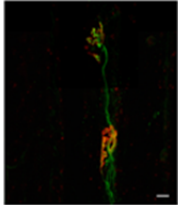
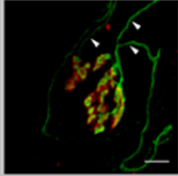
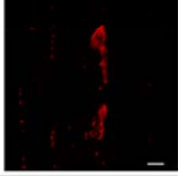
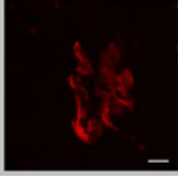
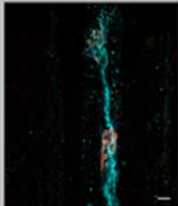
Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W.C., and Mei, L. (2008). LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* *60*, 285-297.

Zhang, F., Strom, A.L., Fukada, K., Lee, S., Hayward, L.J., and Zhu, H. (2007). Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex. *The Journal of biological chemistry* *282*, 16691-16699.

Zhou, H., Chen, G., Chen, C., Yu, Y., and Xu, Z. (2012). Association between extremely low-frequency electromagnetic fields occupations and amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *PloS one* *7*, e48354.

Zucker, R.S. (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology* *9*, 305-313.

# APPENDICE 1 - Grille d'analyse immunohistochimique

	Criteria	Definition	Example
Presynaptic	(1) Denervation	Partial: when part of the end-plate is not recovered by the presynaptic nerve terminal (as seen in the example).  Complete: when the presynaptic element is absent from the end-plate.	
	(2) Terminal sprouting	When the presynaptic element, originating from the end-plate, extends at least 10µm away in any direction or contacts another NMJ. Only sprouts on NMJs fully innervated by a myelinated axon were counted as originating from that NMJ.	
	(3) Polyinnervation	When at least two distinct axons or sprouts were seen entering a single postsynaptic site. Sprouts from unknown origin on partially denervated NMJs or NMJs without a visible large myelinated axon were automatically counted as a source of innervation rather than a sprout originating from that end-plate.	
Postsynaptic	(4) Ectopic AChR	When two nAChR clusters of at least 3µm of diameter belonging to the same endplate were at least separated by 5µm. nAChR are considered as belonging to the same endplate if they are on the same muscle fiber as evaluated by background fluorescence or transmitted light images.	
	(5) Faint clustered nAChR	When the postsynaptic site was noticeably faint, clustered and had a lack of organisation reminiscent of an immature NMJ (Darabid et al 2013).	
Glia	(6) Incomplete glial coverage	When glial cells were not fully covering the presynaptic element. Only en-face NMJs were analysed due to the lack of penetration of the S100β antibody in the tissue.	
	(7) Glial sprouting	Sprouting: When PSCs extended a process associated with a presynaptic sprout (as seen on the right).  Bridge: When at least one PSC extended a process at least 20µm away or contacting another NMJ without being associated with a presynaptic element.	

\* Scale bar = 10 µm